

Université de Montréal

Régulation de l'orientation du fuseau mitotique des divisions cellulaires asymétriques pendant
le développement de la rétine : rôles de SAPCD2 et LGN

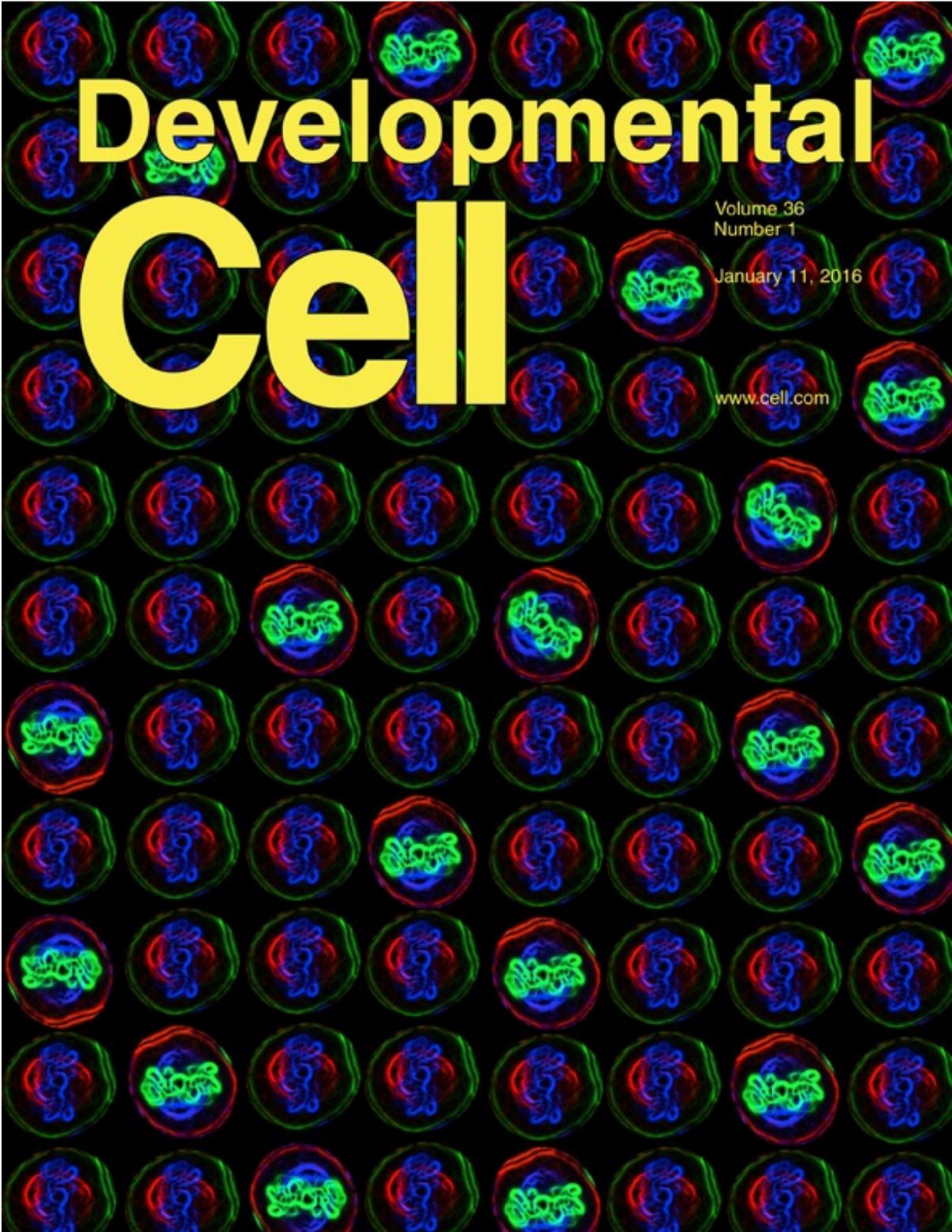
Par Carine Monat-Reliat

Programmes de biologie moléculaire
Faculté de médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de PhD
en biologie moléculaire

6 janvier 2017

© Carine Monat-Reliat, 2017



Developmental Cell

Volume 36
Number 1
January 11, 2016
www.cell.com



Résumé vulgarisé

Pendant la grossesse, une seule cellule permettra de produire des milliards de cellules différentes, grâce à un processus essentiel : la **division cellulaire**. Une cellule se divise en deux cellules, qui se divisent elles-mêmes en deux et ainsi de suite. Ce processus est régulé pour produire le bon nombre de cellules, au bon endroit et au bon moment. Il assure la diversité de cellules nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Environ 200 types différents existent, comme des cellules de la peau, des os, des muscles ou des neurones.

Comment cette diversité de cellule est-elle générée ?

Il existe deux types de divisions : les divisions symétriques qui génèrent deux cellules identiques, et les **divisions asymétriques** qui génèrent deux cellules différentes et assurent la diversité cellulaire ! Pour imaginer une division asymétrique, prenons l'exemple d'une **pomme bicolore**, rouge dans la moitié inférieure et verte dans la moitié supérieure. Si je coupe la pomme de haut en bas (**figure 1A**), j'obtiens deux parties identiques, chacune rouge et verte. Si je coupe la pomme de façon parallèle à la table (**figure 1B**), j'obtiens cette fois deux moitiés différentes, une rouge et une verte, ce qui crée de la diversité. Nous observons avec cette expérience, que le sens de la division, influence l'obtention de deux parties identiques ou différentes.

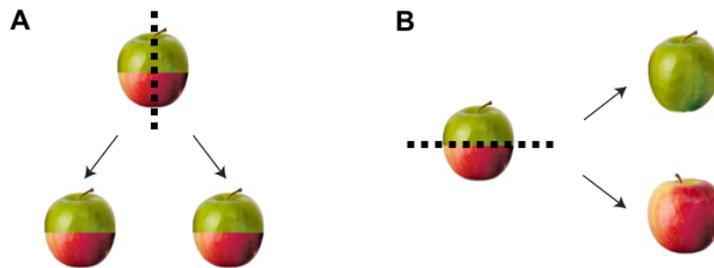


Figure 1. Division symétrique et asymétrique selon le sens de la coupe : modèle de la pomme bicolore.

(A) Une pomme bicolore coupée de haut en bas donne deux pommes similaires, chacune rouge et verte, comme une division cellulaire symétrique. (B) Une pomme bicolore coupée de façon parallèle à la table donne deux pommes différentes, une toute verte et une toute rouge, comme une division cellulaire asymétrique.

Des gènes sont connus pour réguler l'orientation de la division au cours du développement du cerveau et de la peau de souris, ou encore chez la mouche et le ver. Dans cette thèse, nous étudions le développement de **la rétine**. Adultes, nous avons environ 90% de



photorécepteurs, qui sont les cellules qui transforment le signal lumineux en signal électrique transmis au cerveau. La plupart sont produits par les divisions symétriques, qui constituent la quasi-exclusivité des divisions rétiniennes au cours du développement.

Comment sont formés les 10% des autres cellules rétiniennes ? La plupart sont le fruit d'une division asymétrique qui donne un photorécepteur plus un autre neurone. Comme l'orientation de la division influence son devenir asymétrique, nous avons cherché comment cette orientation est contrôlée au cours du développement de la rétine. Nous avons découvert un **nouveau régulateur** nommé **Sapcd2**. C'est un gène peu étudié jusqu'aujourd'hui. Il est actif pendant la division et il interagit avec d'autres gènes clefs impliqués dans la régulation de l'orientation, comme le gène *Lgn*. Nous avons étudié des rétines de souris, prélevées aux stades tardifs du développement rétinien, en absence ou en présence du gène *Sapcd2*. Sans *Sapcd2*, nous observons que le nombre de divisions verticales et asymétriques (**figure 1B**) augmente, comparé aux rétines avec *Sapcd2*. Nous observons l'inverse en absence de *Lgn*, soit une augmentation des divisions horizontales et symétriques (**figure 1A**). Ces résultats montrent qu'en temps normal, au cours des stades tardifs du développement de la rétine, *Sapcd2* maintient les divisions horizontales symétriques (**figure 1A**), alors que *Lgn* maintient les divisions verticales asymétriques (**figure 1B**).

Les souris dans lesquelles *Sapcd2* et *Lgn* sont absents, présentent une malformation du cerveau, et ont une quantité plus importante de neurones dans la rétine, dont certains sont mal localisés, en plus de défauts majeurs très précoces d'orientation des divisions dans la rétine. Nous cherchons le lien entre l'orientation des divisions à des stades précoces du développement de la rétine, et ces défauts dans la formation et la bonne localisation des neurones.

SAPCD2 est **exprimée dans d'autres organes**, comme le cerveau, l'intestin et les poumons. Cette recherche ouvre de nouvelles perspectives sur le rôle éventuel de SAPCD2 dans d'autres types de cellules en division. De plus, SAPCD2 est très fortement exprimée dans de nombreuses **tumeurs cancéreuses**. En diminuant la quantité de SAPCD2 dans ces tissus, la taille de la tumeur diminue. Dans ce contexte cellulaire très différent, le rôle de *Sapcd2* pourrait être lié à celui décrit dans cette thèse, sur la régulation de l'orientation de la division. Cette découverte aiderait ainsi la compréhension de la fonction de *Sapcd2* dans le cancer.



Résumé

La **division cellulaire asymétrique** est un des processus clefs pour générer la **diversité cellulaire** au cours du développement. La régulation de l'orientation du fuseau mitotique est essentielle pour la production de divisions asymétriques. Elle détermine l'héritage asymétrique des déterminants cellulaires entre les cellules filles. Les mécanismes qui contrôlent l'orientation du fuseau mitotique sont bien caractérisés chez le nématode *C. elegans* et la mouche *Drosophila*. Ces modèles ont permis d'identifier les protéines clefs impliquées dans ce processus et conservées chez les mammifères, comme celles du complexe d'orientation du fuseau mitotique : Gai-LGN-NuMA, et celles du complexe de polarité apicale : PAR3-PAR6-aPKC. Chez les vertébrés, la localisation cortico-latérale de LGN-NuMA dans les progéniteurs neuraux en division est déterminante pour l'orientation planaire du fuseau mitotique, mais son mécanisme de régulation reste inconnu.

Nous utilisons la **rétilne** de souris en développement comme modèle expérimental pour sa simplicité et son accessibilité. Des résultats antérieurs de notre laboratoire ont démontré que l'asymétrie de la division dépend de l'orientation du fuseau mitotique, et que cette orientation change au cours du développement. Les rares divisions verticales apparaissent surtout aux stades tardifs de la rétinogénèse. Le but de cette thèse est d'élucider les mécanismes régulateurs du changement d'orientation au cours de la rétinogénèse, et de déterminer le rôle des divisions asymétriques dans les phases prolifératives et neurogéniques du développement de la rétilne.

Avec nos **collaborateurs**, le laboratoire du Dr Stéphane Angers, nous avons identifié **SAPCD2** (*suppressor APC domain containing 2*), comme un nouvel interacteur des protéines Gai, LGN et PAR3. Le rôle du gène *Sapcd2* est peu décrit jusqu'à ce jour. Son expression protéique varie au cours du cycle cellulaire, avec un pic d'expression en mitose, et sa surexpression est observée dans plusieurs cas de cancers. Dans un premier temps, nous avons analysé l'**expression** de *Sapcd2* et *Lgn* dans la rétilne de souris en développement. Leur expression varie selon les phases de la mitose et du stade développemental. À P0, soit le premier jour postnatal, SAPCD2 et LGN ont une localisation cellulaire complémentaire dans les progéniteurs en division, avec un enrichissement à la membrane apicale et au cortex cellulaire latéral respectivement, dans des proportions corrélées au nombre de divisions planaires. Tandis



qu'au jour embryonnaire 14.5 (E14.5), SAPCD2 et LGN sont toutes deux localisées aux pôles du fuseau mitotique, suggérant des rôles dynamiques au cours du développement rétinien. Nous avons ensuite analysé **l'orientation du fuseau mitotique** à E14.5 et P0, dans des souris en absence de *Sapcd2* et/ou *Lgn*. En parallèle de l'étude de la souris *Sapcd2* *-/-*, j'ai participé à l'étude de la souris *Lgn* *-/-* à P0, menée par Dre Marine Lacomme, post-doctorante au laboratoire. En absence de *Lgn* à P0, les divisions horizontales augmentent, à l'inverse de l'absence de *Sapcd2*, où les divisions verticales augmentent. Pour savoir si ces changements d'orientation affectent le destin cellulaire, nous avons réalisé une **analyse clonale** des divisions terminales dans des explants rétiniens. Cette approche permet de suivre l'effet d'une délétion clonale d'un gène dans le lignage d'un seul progéniteur. Comme attendu, l'ablation clonale de *Sapcd2* augmente les divisions asymétriques terminales, produisant deux cellules postmitotiques différentes, et inversement sans *Lgn*. En termes de **mécanisme**, SAPCD2 compétitionne avec NuMA pour se lier à LGN, dont elle régule négativement la localisation au cortex de la cellule.

Le phénotype rétinien des souris doubles mutantes *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* est sévère, avec une quasi-exclusivité de divisions verticales, une augmentation de la prolifération globale, du nombre de cellules mitotiques non apicales, et une drastique expansion de la population neuronale avec une couche cellulaire supplémentaire, composée de presque tous les types cellulaires rétiniens. Cette **hyperprolifération** pourrait être due à l'augmentation des divisions verticales, engendrant une asymétrie de l'héritage du déterminant cellulaire **NUMB**, antagoniste de Notch. Nous faisons l'hypothèse que le progéniteur basal qui n'hérite pas de NUMB, a une capacité proliférative supérieure aux progéniteurs apicaux. Pour la première fois, nous suggérons que les progéniteurs rétiniens ne sont pas équipotents.

Ces travaux ont permis d'identifier un **nouveau régulateur** de l'orientation du fuseau mitotique, et d'élucider la régulation de la localisation cortico-latérale de LGN dans les progéniteurs rétiniens des vertébrés. Ils suggèrent que SAPCD2 et LGN interagissent différemment et changent de rôle au cours de la rétino-genèse. Ces découvertes contribuent à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent la taille du lignage neuronal et régulent la formation de la diversité cellulaire au cours du développement du système nerveux central des vertébrés.

Mots-clés : diversité cellulaire, développement, division asymétrique, rétine



Abstract

The control of cell division orientation is an integral processing during **asymmetric cell division**, a critical process ensuring **cell diversity** by asymmetrically distributing cell fate determinants between daughter cells. Cell fate determinants in invertebrate model organisms such as the *C. elegans* nematode and *Drosophila* fruit fly have been well characterized, and genetic analyses in these organisms has identified the evolutionarily conserved ternary protein complex G α i-LGN-NuMA as essential molecules involved in mitotic spindle orientation, as well as the polarity protein complex PAR3-PAR6-aPKC. Precisely how the G α i-LGN-NuMA complex achieves proper sub-cellular localization in vertebrate neural progenitors to induce planar cell division remains unclear.

We used the **developing vertebrate retina** as a model system to study the role of cell division orientation in cell fate decisions. We have previously demonstrated a link between cell division orientation and daughter cell outcome in neural retina. Specifically, vertical cell divisions have a tendency to give rise to asymmetric pairs of daughter cells, and appear in later stages of retinogenesis. We wished to elucidate the mechanism underlying the switch from planar to vertical cell divisions over time during the neurogenic vs. proliferative developmental phases of retinogenesis.

With our **collaborators** from the University of Toronto in the lab of Dr Stéphane Angers, we identified a novel G α i, LGN and PAR3 interacting protein, named **SAPCD2** (suppressor APC domain containing 2). SAPCD2 is a poorly characterized protein, but known to be expressed in a cell cycle-dependent manner with higher expression during mitosis and elevated expression in many human cancers.

We first analyzed Sapcd2 and Lgn **expression** in the developing retina, and found strong expression during proliferative phases, with its subcellular localization dependent on mitotic phase and developmental stage. During mitoses at P0 (birth), SAPCD2 and LGN display complementary localization with an apical or cortico-lateral enrichment, respectively, suggestive of a role in planar cell division induction. However, at E14.5, SAPCD2 and LGN



have a highly similar localization, independent of spindle orientation, suggesting different roles during retinal development.

We then analyzed **mitotic spindle orientation** in *Sapcd2* and *Sapcd2/Lgn* DKO mice at E14.5 and P0, and *Lgn* mutant mice studied in parallel by Dre Marine Lacomme, post-doc in the Cayouette lab. In the absence of *Sapcd2*, vertical divisions drastically increased, whereas in the absence of *Lgn*, horizontal cell divisions increased.

To test if this reorientation affects cell fate outcome, we analyzed **the lineage of individual progenitor cells**. As expected, in absence of *Sapcd2*, we observed a drastic increase in terminal asymmetric cell divisions, leading to two different neurons; whereas in the absence of *Lgn*, we observed an increase in terminal symmetric cell divisions, leading to two photoreceptors. **Mechanistically**, we showed that SAPCD2 negatively regulates LGN cortical localization, by competing with NuMA for its binding.

In *Lgn;Sapcd2* DKO mice, the mitotic spindle reorientation phenotype is even more drastic, containing almost exclusively vertical cell divisions, combined with an increase of proliferation and non-apical mitoses. This leads to a drastic expansion of the neuronal population, which forms an extra-layer containing many different retinal cell types. This **over-proliferation** could be due to the increase of vertical cell divisions, leading to an asymmetrical distribution of cell fate determinant, **NUMB**, an antagonist of Notch, between daughter cells. We hypothesize that the retinal basal progenitor, without NUMB, has a higher proliferative potential than the apical progenitor. Contrary to previous studies, this suggests that retinal progenitors are not equipotent.

This work identifies a **new regulator** of mitotic spindle orientation and clarifies the sub-cellular localization of the LGN-NuMA complex. Our results also suggest that SAPCD2 and LGN change their role and the way they interact throughout the course of retinogenesis. This research contributes to an understanding of both how neural number is regulated, and how cell diversity is generated during vertebrate central nervous system development.

Keywords : cell diversity, development, asymmetric cell division, retina



Préface

Cette thèse est un manuscrit hybride, avec un premier chapitre de résultats sous forme d'un article publié en tant que co-première auteure (Chiu *et al.* 2016), et un deuxième chapitre de résultats contenant à la fois des résultats d'un second article publié auquel j'ai participé (Lacomme *et al.* 2016), ainsi qu'un manuscrit en préparation. La thèse est divisée comme suit, en quatre chapitres :

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS et MÉTHODES

Ce chapitre contient un article publié (Chiu *et al.* 2016) : Chiu CW*, Monat C*, Robitaille M, Lacomme M, Daulat AM, Macleod G, McNeill H, Cayouette M, Angers S. (2016) *SAPCD2 controls spindle orientation and asymmetric divisions by negatively regulating the Gai-LGN-NuMA ternary complex*. *Dev Cell*. 2016 Jan 11; 36(1):50-62. doi: 10.1016/j.devcel.2015.12.016. * Co-premières auteures

Preview de l'article en annexe 4 (Li et Wang 2016). Couverture de la revue *Dev Cell*, que j'ai réalisée, en première page de la thèse.

CHAPITRE 3 : MÉTHODES, RÉSULTATS et DISCUSSION

Ce chapitre contient des résultats d'un article publié (Lacomme *et al.* 2016) et d'un manuscrit en préparation. Article publié : Lacomme M, Tarchini B, Boudreau-Pinsonneault C, Monat C, Cayouette M. (2016) *The LGN protein promotes planar proliferative divisions in the neocortex but apicobasal asymmetric terminal divisions in the retina*. *Development*. 2016 Feb 15; 143(4):575-81. doi: 10.1242/dev.129783. L'article publié complet est en annexe 3 (Lacomme *et al.* 2016).

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE DE LA THÈSE



Table des matières

Résumé vulgarisé.....	ii
Résumé	iv
Abstract	vi
Préface	viii
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations.....	xvi
Remerciements	xxi
Prologue	xxiv
Avant-propos	26
Chapitre 1 : Introduction.....	28
LA DIVISION CELLULAIRE ASYMÉTRIQUE	28
I. La division asymétrique comme source de diversité cellulaire	28
II. Les débuts de la division cellulaire.....	31
III. Modèle de la rétine.....	34
IV. Modes de divisions cellulaires	34
V. Les trois étapes d'une division cellulaire asymétrique intrinsèque	36
LE DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX RÉTINIEN COMME MODÈLE D'ÉTUDE DE L'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE	62
I. Développement de l'œil chez les vertébrés	62
II. La rétine adulte	63
III. Développement de la rétine : prolifération, différenciation et spécification ...	67
IV. Objectifs d'étude	80
V. Sapcd2.....	81



VI. Projet de thèse.....	84
Chapitre 2 : Résultats sous forme d'article publié.....	87
Authors contributions	87
SAPCD2 CONTROLS SPINDLE ORIENTATION AND ASYMMETRIC DIVISIONS BY NEGATIVELY REGULATING THE G α i-LGN-NuMA TERNARY COMPLEX.....	88
Authors and affiliations.....	88
Résumé.....	89
Summary.....	90
Introduction	91
Results	93
Discussion.....	108
Experimental procedures	112
Acknowledgements.....	114
Supplemental information	114
Supplementary experimental procedures	119
Chapitre 3 : Résultats et discussion	126
Contributions des auteurs	126
SAPCD2 ET LGN RÉGULENT L'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE AU COURS DE LA PHASE PROLIFÉRATIVE DE LA RÉTINOGENÈSE	127
Méthodes expérimentales.....	127
Résultats et discussion	130
Chapitre 4 : Discussion générale.....	155
I. Conclusion	155
II. Comment les protéines SAPCD2 et LGN interagissent-elles ensemble ?....	157
III. Mécanisme d'ancrage et de polarisation de SAPCD2 et LGN.....	158
IV. Expression spatio-temporelle de la protéine NuMA et son interaction avec SAPCD2 et LGN dans les progéniteurs rétiniens	168
V. Rôle potentiel de SAPCD2 dans les centrosomes	170



VI. Comment SAPCD2 et LGN régulent-t-elles la prolifération cellulaire, les mitoses non apicales et la localisation ectopique de certaines cellules ? 172

VII. Est-ce que le rôle de SAPCD2 dans la régulation de l'orientation de la division cellulaire est conservé dans l'épiderme et le neuroépithélium de *Drosophile* et vertébrés ? 174

VIII. Quand est-ce que l'orientation finale du fuseau mitotique est déterminée ? 175

Conclusion..... 177

Bibliographie..... i

Annexe 1, *supplementary table 1, related to figure 25*..... xxxvi

Annexe 2, *supplementary table 2, related to figure 25*..... xxxvii

Annexe 3, article (Lacomme *et al.* 2016)..... xlii

Annexe 4, *preview de l'article (Chiu et al. 2016) : (Li et Wang 2016)*.....xi



Liste des tableaux

Tableau I.	Homologues et caractéristiques des protéines de polarité, d'orientation du fuseau mitotique ou des déterminants cellulaires chez <i>C. elegans</i> , la <i>Drosophile</i> et les vertébrés.....	38
Tableau II.	Supplementary table 1, related to figure 25 (annexe 1).....	119
Tableau III.	Supplementary table 2, related to figure 25 (annexe 2).....	119
Tableau IV.	Antibodies used in this study	121
Tableau V.	Anticorps utilisés dans ce chapitre, et la fixation du tissu correspondante.....	128



Liste des figures

Figure 1.	Division symétrique et asymétrique selon le sens de la coupe : modèle de la pomme bicolore.	ii
Figure 2.	Les travaux neuroscientifiques du pionnier Santiago Ramón y Cajal.	27
Figure 3.	La diversité cellulaire formée au cours du développement.	29
Figure 4.	Les divisions cellulaires asymétriques induites par des signaux extrinsèques et intrinsèques.	30
Figure 5.	Les trois étapes intrinsèques essentielles à la division cellulaire asymétrique.	31
Figure 6.	Les premières représentations de la cellule en mitose.	32
Figure 7.	Les cinq modes de divisions cellulaires dans le système nerveux.	35
Figure 8.	Régulation des divisions cellulaires asymétriques dans différents modèles.	40
Figure 9.	Répartition du déterminant cellulaire NUMB/mNUMB.	43
Figure 10.	Catégories d'angles et mesure de l'orientation de la division cellulaire en trois dimensions.	45
Figure 11.	Structure de la protéine LGN.	48
Figure 12.	Attraction des microtubules par NuMA pour orienter le fuseau mitotique.	54
Figure 13.	Régulation de l'orientation apico-basale et planaire.	57
Figure 14.	Mécanismes d'action de LGN avec Gai, NuMA, AFADIN et DLG.	58
Figure 15.	Le développement de l'œil.	62
Figure 16.	Représentations de la rétine au début et à la fin du XXe siècle.	64
Figure 17.	Structure de la rétine adulte des vertébrés.	66
Figure 18.	Migration intercinétique des noyaux.	67
Figure 19.	Différenciation chronologique des cellules rétinienne de rat et leur proportion.	69
Figure 20.	Rétinogenèse et spécificité génique des types cellulaires.	75
Figure 21.	L'orientation du fuseau mitotique influence le devenir asymétrique des divisions cellulaires dans la rétine.	79
Figure 22.	Structure de la protéine SAPCD2.	81
Figure 23.	Expression embryonnaire de l'ARN Sapcd2.	82



Figure 24.	Graphical abstract	90
Figure 25.	SAPCD2 interacts with the G α i-LGN complex.	94
Figure 26.	SAPCD2 is expressed in mitosis and localizes to the apical domain in mouse retinal progenitors.	98
Figure 27.	SAPCD2 is required for epithelial morphogenesis in MDCK cysts.	100
Figure 28.	SAPCD2 is required for planar cell divisions in the mouse retina.	102
Figure 29.	SAPCD2 is required for terminal symmetric cell divisions in the developing mouse retina.	104
Figure 30.	SAPCD2 regulates LGN cortical localization.	106
Figure 31.	Proposed model for SAPCD2 function in spindle orientation.	111
Figure 32.	(figure S1) HA-SAPCD2 co-immunoprecipitates with FLAG-PARD3, related to figure 25.	114
Figure 33.	(figure S2) SAPCD2 antibody validation and ectopic SAPCD2 localization, related to figure 26.	115
Figure 34.	(figure S3) <i>Sapcd2</i> inactivation has no effect on proliferation, apoptosis, localization of key polarity players and NUMB inheritance <i>in vivo</i> , related to figure 29.	116
Figure 35.	(figure S4) The shRNA-mediated knock-down of <i>Sapcd2</i> in RPCs increases asymmetric terminal divisions at the expense of symmetric terminal divisions, related to figure 29.	117
Figure 36.	(figure S5) SAPCD2 overexpression does not change LGN expression levels nor G α i cortical localization, related to figure 30.	118
Figure 37.	LGN est requis pour les divisions verticales et les divisions cellulaires asymétriques terminales à P0 dans la rétine.	131
Figure 38.	SAPCD2 et LGN sont exprimées dans les progéniteurs rétiniens précoces... ..	134
Figure 39.	Précocement, SAPCD2 et LGN sont requis pour réguler les divisions planaires	137
Figure 40.	L'absence de <i>Sapcd2</i> et <i>Lgn</i> engendre une malformation du cerveau, et affecte sévèrement la rétinogenèse avec une augmentation de la population neuronale	140



Figure 41. L'inactivation de *Sapcd2* et *Lgn* augmente la prolifération et les mitoses non apicales..... 142

Figure 42. Modèle d'hyperprolifération 145

Figure 43. La surexpression de mNUMB dans des progéniteurs rétiniens précoces diminue la prolifération..... 146

Figure 44. Photoconversion et enregistrement par imagerie en temps réel de progéniteurs en division dans des explants de rétine..... 148

Figure 45. L'inactivation clonale de *Sapcd2* en l'absence de *Lgn* augmente le nombre de cellules bipolaires et Müller, et n'affecte pas la prolifération. 151

Figure 46. Modèle moléculaire de la régulation de l'orientation des progéniteurs au cours de la rétino-genèse, par SAPCD2 et LGN 155

Figure 47. Protéines interagissant avec SAPCD2, identifiées dans notre crible protéomique (figure 25A)..... 159



Liste des abréviations

Les abréviations utilisées sont souvent celles issues de l'expression en anglais, pour faciliter la concordance avec les figures issues de l'article, en anglais, et de la littérature scientifique.

A549 : cellules de cancer du poumon
ADN : acide désoxyribonucléique
AGS3 : activators of G protein signaling
AJC : complexe des jonctions apicales
Ama : cellules amacrines
APC : adenomatous polyposis coli
aPKC : atypical protein kinase C
Ascl1 : achaete-scute family bHLH transcription factor 1
Asp et Asp^m : abnormal spindle et abnormal spindle-like microcephaly associated protein
ASPP1 et ASPP2 : apoptosis-stimulating protein of p53 1 et 2
Ath5 : Atonal homolog 5
Atoh7 : Atonal bHLH transcription factor 7
ARN : acide ribonucléique
*b*FGF : basic fibroblast growth factor
bHLH : basic helix-loop-helix
Bip : cellules bipolaires
Blimp1 : B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BMP : bone morphogenetic protein
Brat : brain tumor
BrdU : bromodeoxyuridine
Brn3a et Brn3b : brain specific homeobox 3a et b
C9orf140 : chromosome 9 open reading frame 140
Caco-2 : lignée cellulaire tumorale humaine isolée d'un adénocarcinome colique (intestin)
CAK : CDK activating kinases
Casz1 : Castor
CBAP : common β -chain associated protein
CBP : calmodulin-binding affinity tag
CC3 : cleaved caspase 3
CDK : cyclin-dependent kinase
CENP-E et CENP-J : centromere-associated protein E et J
Chx10 : ceh-10 homeo domain containing homolog
CITK : cytokinesis regulator citron kinase
CKi : CDK inhibitor
COS7 : lignée cellulaire isolée de fibroblastes de rein de singe 7
CRALBP : cellular retinaldehyde-binding protein
CRB1, CRB2 et CRB3 : crumb1, 2 et 3
Crx : cone rod homeobox



Dapi : 4,6 Di aminodino-2-phényl indole
 DCLK : doublecortin-like kinase
 div : division
 dlg : discs large
 Dfnb82 : deafness, autosomal recessive 82
 DSH : dishevelled
 E : jour embryonnaire
 EDTA : éthylène diamine tétraacétique
 EFTF : eye field transcription factor
 EGF : epidermal growth factor
 ET : Eye-T box
 FGF : fibroblast growth factor
 Foxn4 : forkhead box N4
 Fz : frizzled
 GAP : GTPase-activating protein
 GCL : couche des cellules ganglionnaires (*ganglion cell layer*)
 GDF11 : growth differentiation factor 11
 GDI : guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor
 GEF : guanine nucleotide exchange factor
 GFP : green fluorescent protein
 GLAST : glutamate-aspartate transporter
 GMC : cellule ganglionnaire mère basale (*ganglion mother cell*)
 GOA1 : guanine nucleotide-binding protein G (o) subunit alpha
 GPA16 : G protein alpha subunit
 GPR : G protein regulator
 GPR1 et GPR2 : G protein regulator 1 et 2
 GPSM1 et GPSM2 : G protein signaling modulator 1 et 2
 GS : glutamine synthetase
 HA : hemagglutinin
 HAUS4 : HAUS augmin like complex subunit 4
 HE : Coloration *hematoxylin* et *eosin*
 HEK293T : lignée de cellules rénales embryonnaires humaines
 HeLa : métastase du cancer du col de l'utérus d'Henrietta Lacks
 hes1 et hes5 : mammalian hairy and enhancer of split homolog 1 et 5
 HPC-1 : syntaxin 1
 Ikzfl : ikaros
 INADL : InaD-like
 INL : couche nucléaire interne (*intern nuclear layer*)
 INM : migration nucléaire intercinétique (*interkinetic nuclear movement*)
 IP : progéniteur intermédiaire
 IPL : couche plexiforme interne (*intern plexiform layer*)
 IP-MS : immunoprécipitation combinée à de la spectrométrie de masse



Insc : inscuteable
 Isl1 : islet 1, insulin gene enhancer protein
 KHC-73 : moteur kinésine 73
 Lgl : lethal giant larvae
 LGN : leucine-glycine-asparagine ou Leu-Gly-Asn repeat-enriched
 Lhx2 : LIM homeobox 2
 LIM1/ Lhx1 : LIM homeobox 1
 Lin-5 : spindle apparatus protein lin-5, abnormal cell LINEage
 Lis1 : lissencephaly 1
 Lnx2 : ligand of NUMB protein X 2
 MAGUK : membrane-associated guanylate kinase
 Mals3 (Lin7C) : mammalian lin-seven protein 3
 Mash1 : mammalian achaete scute homolog 1
 Math3 et Math5 : mammalian atonal homolog 3 et 5
 MCF-7 : cellules de cancer du sein
 MCPH5 : microcephaly 5
 MDCK : lignée de cellules de rein de chien (*madin-darby canine kidney*)
 MIRA : miranda
 MPDZ : multiple PDZ domain
 MPP5 : membrane palmitoylated protein 5
 Mü ou Mu : cellules de Müller
 Mud : mushroom body defect
 MUPP1 : multiple PDZ domain protein isoform 1
 NB : neuroblaste
 NDE1/NDEL1 : nudE neurodevelopment protein 1
 NeuroD4 : neuronal differentiation 4
 NR : neural retina
 Nr2e1 : nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1
 Nrl : neural retina leucine zipper
 NuMA : nuclear and mitotic apparatus
 Oct1 et Oct2 : onecut 1 et onecut 2
 ONL : couche nucléaire externe (*outer nuclear layer*)
 OPL : couche plexiforme externe (*outer plexiform layer*)
 oRG : progéniteurs radio-gliaux externe
 Otx2 : orthodenticle homeobox 2
 P : jour postnatal
 PALS1 : protein associated with lin seven 1
 Par2, Par3 et Par6 : partitioning defect 2, 3 et 6
 PATJ : protein associated with tight junctions
 Pax6 : paired box protein 6
 PC12 : lignée cellulaire de phéochromocytome de rat, tumeur rare des glandes surrénales
 PCL : progenitor cell layer



PCP : polarité planaire, *planar cell polarity*
 PCR : polymerase chain reaction
 PFA : paraformaldehyde
 Ph : photorécepteur
 pH3 : phospho-histone 3
 Pins : partner of inscuteable
 Plk1 : polo-like kinase 1
 PON : partner of NUMB
 Pou4f1 et Pou4f2 : POU class 4 homeobox 1 et 2
 PPP1R13B : protein phosphatase 1 regulatory subunit 13B
 Prdm1 : PR domain zinc finger containing 1
 Pros : prospero
 Prox1 : prospero homeobox 1
 PRR : proline rich region
 PTB : phospho tyrosine binding domain
 Ptf1a : pancreas transcription factor 1a
 RG : progéniteurs radio-gliaux
 RGC : cellule ganglionnaire (*retinal ganglion cell*)
 RPCs : retinal progenitor cells
 RPE : épithélium pigmenté rétinien (*retinal pigment epithelium*)
 RPL : retinal progenitor cell layer
 Rx/Rax : retina and anterior neural fold homeobox
 Sapcd2 : suppressor APC domain containing 2
 SBP : streptavidin-binding affinity tag
 SCRIB : scribble
 SDT : stardust
 SEM : standard error of the mean
 Shh : sonic hedgehog
 Six3 et Six6 : sine oculis homeobox 3 et 6
 SOP : sensory organ precursor
 Sox9 : sex-determining region Y-box containing gene 9
 Tbx3 : T-box 3
 TCA : trichloroacetic-acid
 TMEM102 : transmembrane protein 102
 TP53BP2 : tumor protein p53 binding protein 2
 TPR : répétitions tétratricopeptides
 TUJ1 : tubulin β 3 class III
 Tunel : Terminal deoxynucleodityl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labelling
 VCL : vinculin
 VELI3 (LIN7C) : vertebrate lin-seven homolog 3
 Wnt : Wingless
 ZO-1 : zona occludens 1



« Comme l'entomologiste en quête de papillons aux couleurs vives, mon attention cherchait, dans le jardin de la matière grise, des cellules aux formes élégantes et délicates, les mystérieux papillons de l'âme. »

Santiago Ramón y Cajal, 1917, "Souvenirs de ma vie".

« La dissymétrie c'est la vie. L'univers est dissymétrique. »

Louis Pasteur, 1848, "La dissymétrie moléculaire".

À mes grands-parents,

À mes parents.

XX



Remerciements

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, Dr Michel Cayouette pour son soutien, son écoute, sa confiance, et son optimisme sans failles tout au long de mon doctorat. Michel, je te remercie pour tes conseils judicieux et pour rester toujours positif à l'égard de nos résultats. Je te suis reconnaissante des qualités et des valeurs que tu nous transmets dans le laboratoire, d'esprit critique, de rigueur intellectuelle, d'égalité entre les membres du labo et de ta passion pour la recherche scientifique. Merci pour ta patience, ton écoute et ta confiance. Merci de m'avoir poussée à croire en moi, à maintes reprises, merci de m'avoir laissée explorer les autres sphères de diffusion de la science, et merci d'avoir fait grandir la scientifique qui est en moi, ainsi que pour toutes nos discussions informelles, ton support moral, et les rencontres d'équipe à l'extérieur du labo.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse, Dre Adriana Di Polo, Dr Jean-François Côté et Dr Sébastien Carreno pour votre appui, votre suivi, vos conseils et vos questions qui m'ont permis de progresser. Je remercie les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de relire et commenter cette thèse de doctorat et de me questionner lors de la défense, Dre Marie Kmita, Dr Gregory Emery, Dr Vincent Pernet et Dr Richard Bertrand. Je remercie tou-tes les membres des "neurolabs" pour nos rencontres hebdomadaires.

Je remercie chaleureusement nos collaborateurs à Toronto, en particulier Dr Stéphane Angers et ma camarade au doctorat Catherine Chiu. Ce fut une collaboration des plus agréable. Je remercie Stéphane pour ses commentaires, son soutien, sa confiance et son dynamisme. Je remercie Catherine pour tous nos échanges fructueux et solidaires, pour l'envoi des souris au début du projet et pour les expériences réalisées ensemble à Toronto, et l'amitié qui en est née.

Je remercie également les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin à l'IRCM, toujours avec le sourire : Dominic Filion de la plateforme microscopie pour nos réflexions de trigonométrie, son aide dans la création du programme Matlab pour mesurer les angles, et pour dompter le confocal, le spinning-disk et les différents microscopes ; Jessica Barthe pour la gestion impeccable des souris ; Renée, Jean-François, Richard et Robert pour leur soutien pratique, technique et informatique.



Bien sûr, je tiens à remercier toute l'équipe du labo Cayouette pour nos discussions, nos sorties, nos labmeetings et la bonne ambiance dans le laboratoire. Je remercie tout particulièrement Marine, pour notre collaboration à chacun de mes projets, pendant tout le doctorat. Marine, je te remercie pour le sourire quotidien dont tu as le secret, pour nos multiples discussions scientifiques, pour ton aide à la réalisation de plusieurs expériences, ta bonne humeur, ton moral, ta force, ton soutien, ta disponibilité ; pour ta relecture et tes conseils précieux pour la rédaction de ce manuscrit, pour partager les lits de chaque retraite et conférence ;-), pour tes conseils vestimentaires ;-)) et pour notre amitié.

Merci Christine, pour ton aide inconditionnelle, tes conseils, ta patience incroyable, ton sourire, ta bonne humeur, ta disponibilité, ta gentillesse, ta bienveillance et ta générosité. Merci pour nos discussions scientifiques et la formation que tu m'as offerte, comme à chacun-e, pour toutes les expériences que j'ai réalisées. Et merci bien sûr pour toutes nos autres discussions, pour ton soutien moral, ton support et tes conseils pour gagner en confiance. Merci pour ces précieux échanges, nos sorties (sur les plaines!) et pour Téo et Pico ;-)) La liste des mercis est sans fin, merci d'être venue me chercher à Lachine au moment où j'en avais tant besoin, merci d'être si rayonnante au quotidien.

Merci Vas, thanks a lot for all your support, our scientific (or not) discussions. Thanks for letting me go into your steps, for your efforts to improve my english, for presenting me everybody you knew, for our lab nights in french, spanish... for your wise advices each time I was asking for. Thanks for your scientific support. Thanks to you and Julie for our amazing trip in India. Et merci Julie, pour toutes nos discussions, pour m'avoir inspirée de nouveaux projets et nos tentatives de café remises à plus tard :-)).

Je remercie Basile pour nos discussions tardives, sa rigueur, son scepticisme formateur et ses commentaires. Je remercie Pierre pour ses réponses (sans fin!) à mes questions. Je remercie Adèle pour son grain de folie, nos discussions, son aide en anglais. Je remercie Mike pour sa relecture et ses conseils précieux pour la rédaction de ce manuscrit, et la réalisation de whole-mount ! Je remercie Camille et Awaïs pour nos discussions scientifiques, leur humanité et leur ouverture d'esprit. Je remercie Milanka et Michel pour leur motivation et leurs conseils "so 2016" :-)). Je remercie Ko de donner une seconde vie à Sapcd2 dans le labo ;-)).



En terminant, je remercie Damien et toute l'équipe de l'œuf ou la poule pour leur soutien et leur amitié. Damien pour nos interminables discussions et notre projet scientifico-radiophonique. Marion pour notre belle amitié, Julien et Basile pour ma foi en l'avenir :-) Vous trois, Nadia et Jen pour votre accueil. Pour mon quotidien à l'institut, je remercie Jen en particulier d'avoir été là aux moments importants et pour tes sages analyses, Ludi, Stephen, Noumeira, Aurèle, Julien, Tiphaine, Léa, Yacine, Alexandre, Anne-Marie, Julie, Adeline, Ronan, Daniel, Tyler, Lucas, Marie, Mélanie, Shannon et Nicolas Stifani pour m'avoir appris à utiliser endnote et me dépanner à tout moment. Je remercie Anaïs, Karisha, Caro, Momo, Jo et Zo, Elsa, Thomas, Charlène, Vincent, Leïla, Brahim, Émilie, Denisa, Vincent, Anaïs, Carlos, Cédric, Adeline et Loïc, Camille, Pauline pour leur support et leur amitié toutes ces années.

Je ne saurais comment remercier Tristan de son incommensurable soutien, support et amour au quotidien, et particulièrement dans les périodes plus difficiles où beaucoup aurait fait demi-tour. Merci de booster ma curiosité, mon esprit critique, mon besoin d'aventure, ma confiance en moi et en l'avenir. Merci pour ton ouverture. Je te suis reconnaissante et te remercie pour tous tes petits plats, tes conseils, tes lectures et relectures, ton écoute (à toute heure...), ta patience, et pour les backgammons, la radio, McLeod, Eusebio ... Merci d'être et d'avoir été toujours là. Je t'aime jusqu'à la lune, et retour.

Je termine en remerciant ma famille, mes parents, mes grands-parents, ma sœur, mes cousines, cousins, oncles et tantes, Pascal, Gigi, Thomas, Joce et ma belle-famille. La distance a été difficile, mais nos rendez-vous skype n'en étaient que plus riches. Merci de croire en moi, de m'aimer, me soutenir dans mes projets et de me rappeler qu'il faut aller dormir et manger correctement :-) Merci d'être venus nous visiter, et pour les lettres touchantes de mes grands-parents du Puy et le soutien indéfectible de mes grands-parents d'Ussel, grâce à qui ma curiosité et mon esprit critique ont été exacerbés depuis toute petite et resteront vifs. Merci à Clem d'être debout à l'heure où tout le monde dort :) Merci à Mag pour les conseils du quotidien. Merci à Manon d'assurer la relève :-) accompagnée de Mathis et Orlan. Merci à mes parents d'être toujours là quand il faut, à toute heure. Merci pour votre patience, votre amour, votre humour, votre générosité et votre ouverture d'esprit. Merci à toutes et à tous pour votre soutien, votre optimisme et votre chaleur. Je vous aime.

Carine



Prologue

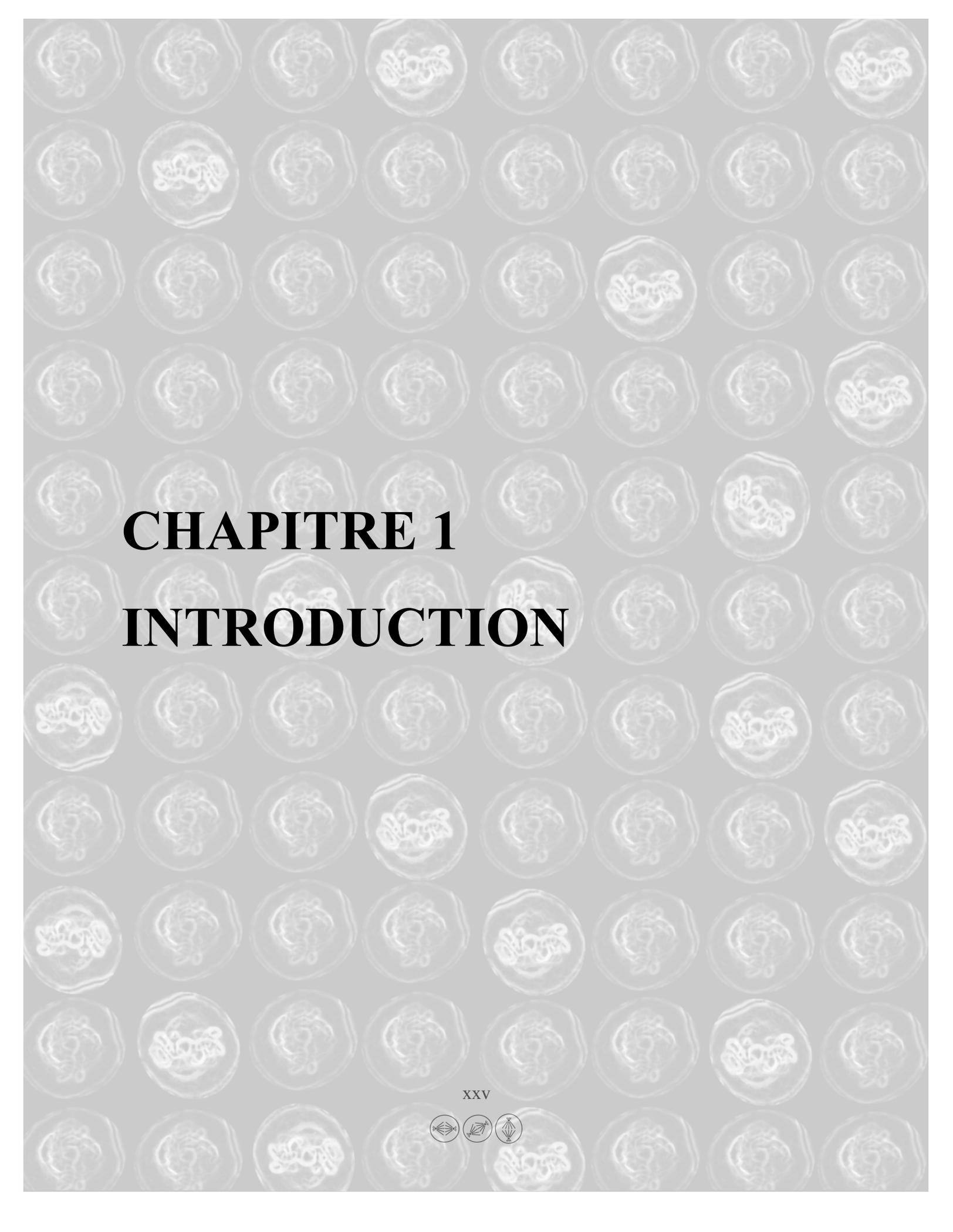
Après moult réflexions quant à la rédaction de cette section, m'y voici penchée. Non pas que cette précision implique un biais de ma part, si ce n'est une certaine motivation pour ce domaine de recherche, qu'est l'exploration du système visuel, et mon intérêt particulier pour l'actualité des thérapies contre la cécité. Je dédie cette thèse à la moitié de la famille maternelle, atteinte d'une mutation dominante engendrant une rétinite pigmentaire - que j'ai le goût de qualifier de foudroyante, seulement pour le jeu de mots de la foudre, éclair, lumière, clair-obscur. Obscurité subie, un peu plus qu'autrui, la nuit et ce dès la vingtaine. Les alentours se font sombres également. À 40 ans, on oublie la conduite, les allées noires des théâtres, en se gardant de devenir acariâtre. À la retraite, on compte sur son entourage, plus que sur son âge, pour ne pas confondre l'eau et le vin, trouver le pain et le bain. Figurant parmi la moitié chanceuse non atteinte, et pour me délivrer de l'étreinte, il m'a semblé minimalement juste, de contribuer en toute humilité, à la recherche de solutions sans tergiversation, pour la vision. Non pas que mon grand-père soit en demande, mais pour ma cousine, certes ingénieuse future ingénieure du son, faisant fi de la vision!, je lui souhaite de pouvoir embrasser son prochain, de côté, comme de nuit, sans avoir à tâtonner, dotée de tous ses bâtonnets.

Certes dans cette thèse, la rétine n'est que modèle, aussi centrale fut-elle dans mon cheminement scientifique. De Trois-Rivières, à la recherche -fondamentale- de plasticité cérébrale chez des souris aveugles précocement ou tardivement ; jusqu'à l'Institut de la vision, à Paris, en recherche appliquée à tenter de différencier des cellules souches d'embryons humains en photorécepteurs. Science trop balbutiante à mes yeux, je dévale vers du concret -fondamental- à Montréal, dans le laboratoire d'aujourd'hui pour livrer la thèse que voici.

Une division orientée pour la diversité.

Carine





CHAPITRE 1

INTRODUCTION



Avant-propos

Parmi les théories les plus importantes de l'histoire de la biologie, figure celle de la **cellule**, qui stipule que tout organisme vivant est composé d'au moins une cellule, **unité fondamentale structurelle et fonctionnelle du vivant**.

Depuis l'Antiquité, l'infiniment grand comme l'infiniment petit fascine. Tout progrès scientifique va de pair avec l'avancement technologique, l'invention du **microscope**, attribuée au hollandais Zacharias Janssen (1585-1632), au tout début du XVIIe siècle, permet d'explorer le monde invisible à l'œil nu. Il crée un microscope dit "composé", en l'occurrence de plusieurs lentilles dans des tubes coulissants, qui grossit de trois à dix fois l'objet observé. Dans les années 1660, le naturaliste anglais Robert Hooke (1635-1703) fabrique son propre microscope composé amélioré, et observe pour la première fois une cellule végétale de liège, qu'il dessine et publie parmi d'autres observations, dans un recueil appelé *Micrographia* en 1665. Il est le premier à utiliser le mot "**cellule**", du latin *cella*, diminutif de *cellula*, pour "petite chambre". Qu'il s'agisse d'une alvéole de ruche, d'une cellule de prison, ou photovoltaïque, en passant par la cellule de crise et le cellier, la cellule est une petite structure fermée élémentaire à un ensemble.

Les scientifiques Marcello Malpighi (1628-1694) et Nehemiah Grew (1641-1712) caractérisent des cellules de plantes, Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) observe pour la première fois des cellules animales dans des échantillons d'eau, de sang et de sperme. Deux siècles plus tard, Matthias Schleiden (1804-1881) et Theodor Schwann (1810-1882) formulent l'ébauche de la **théorie cellulaire** : tous les organismes vivants sont constitués au moins d'une cellule, que Rudolf Virchow (1821-1902) complète en 1858 en écrivant "*omnis cellula e cellula*", que "chaque cellule naît à partir d'une autre cellule", contrairement à la théorie de la génération spontanée largement répandue à l'époque.

Le corps humain est constitué de milliards de cellules, qui diffèrent de par leur taille, leur forme et leur fonction. Il existe environ 200 types cellulaires différents. Pouvant atteindre plus d'un mètre, le **neurone**, du grec ancien *neûron* pour "fibre", est l'unité de base du système

nerveux. Composé d'un corps cellulaire, un axone et des dendrites, ces prolongements caractéristiques leur permettent de communiquer entre eux.

Les neurones sont décrits pour la première fois grâce aux colorations du médecin italien **Camillo Golgi** (1843-1926) qui crée une technique à base de nitrate d'argent, qu'il appelle la "*reazione nero*" ou "réaction noire" pour la couleur noire que cette méthode confère aux neurones. Quelques années plus tard, le pathologiste et neuroscientifique espagnol **Santiago Ramón y Cajal** (**figure 2A**) améliore la coloration de Golgi, observe, caractérise et dessine d'innombrables régions du système nerveux, dans plusieurs modèles animaux (**figure 2B**). Tous deux décrivent pour la première fois la diversité neuronale, et se partagent le prix Nobel de physiologie ou médecine de 1906.

Comment cette diversité cellulaire est-elle générée au cours du développement ?

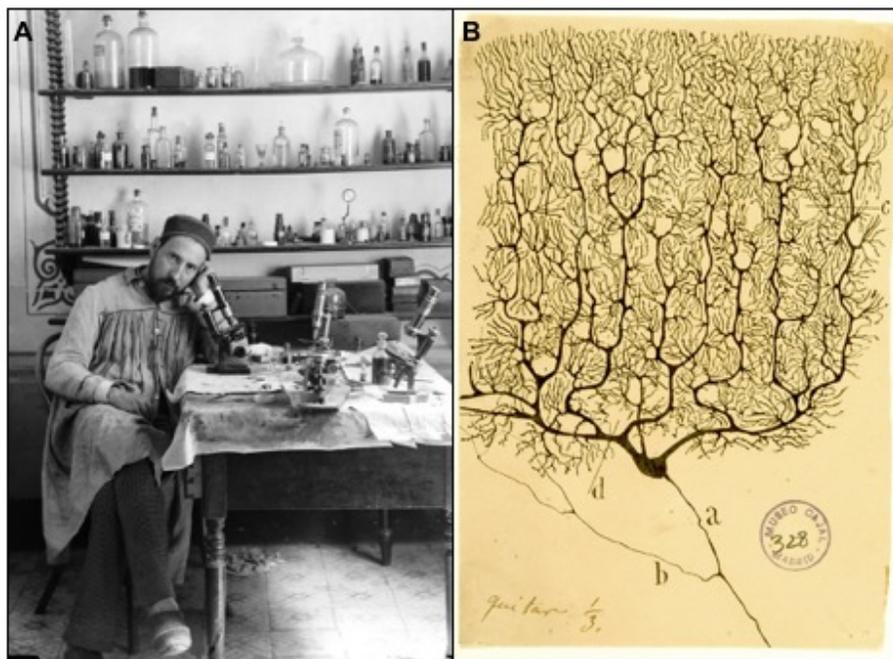


Figure 2. Les travaux neuroscientifiques du pionnier Santiago Ramón y Cajal. (A) Portrait de Santiago Ramón y Cajal à Valence, en Espagne. 1885 © Legado Cajal (CSIC). Instituto Cajal, Madrid, Espagne. (B) Dessin à l'encre de Ramón y Cajal d'une cellule de Purkinje, marquée par la technique de Golgi. 1899. a : axone, b : collatérale d'axone, d : dendrites. © Legado Cajal (CSIC). Instituto Cajal, Madrid, Espagne.



Chapitre 1 : Introduction

LA DIVISION CELLULAIRE ASYMÉTRIQUE

I. La division asymétrique comme source de diversité cellulaire

Tout organisme multicellulaire à reproduction sexuée provient d'une seule cellule-œuf, capable de générer l'intégralité de la diversité des types cellulaires. Les **divisions** de cette première cellule et des suivantes sont cruciales. Elles assurent le bon développement de l'organisme multicellulaire, en régulant la morphogenèse du tissu, sa taille et son architecture globale. Chez l'adulte, elles contrôlent l'homéostasie tissulaire, la croissance des tissus et la régénération de ceux endommagés, par l'autorenouveaulement des cellules souches adultes (Gillies et Cabernard 2011, Morin et Bellaiche 2011, Peyre et Morin 2012). Des défauts de régulation de ces divisions peuvent être responsables de certains types de cancers, dus à un excès de prolifération, et de maladies développementales (Fish *et al.* 2006, Knoblich 2010, Quyn *et al.* 2010, Noatynska *et al.* 2012, Bergstralh et St Johnston 2014).

Un **progéniteur** est une cellule proliférative qui peut donner un ou plusieurs types cellulaires différents (**figure 3**). La fine régulation spatio-temporelle de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs assure le bon nombre de cellules à générer, leur identité, leur localisation et leur moment de production. Comment sont-ils générés ? Quels sont les mécanismes cellulaires et moléculaires qui assurent la diversité cellulaire au cours du développement du système nerveux central (**figure 3**) ? Telle est la question générale de cette thèse.



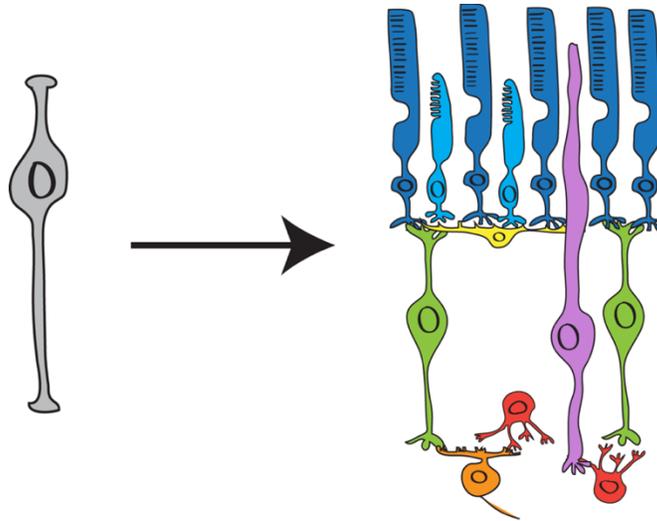


Figure 3. La diversité cellulaire formée au cours du développement.

Au cours du développement (flèche), un progéniteur commun multipotent (gris) est capable de former de nombreux types cellulaires différents (couleurs). Exemple des cellules qui constituent la rétine neurale adulte.

La **diversité cellulaire** peut résulter de plusieurs phénomènes, comme l'expression spécifique de facteurs de transcriptions. Ils sont exprimés de façon hétérogène dans différentes régions du tube neural, à l'origine de tout le système nerveux. Ils se fixent sur l'ADN pour activer ou bloquer l'expression d'autres gènes. L'épigénétique joue également un rôle dans la façon dont les gènes vont être exprimés par la cellule pour créer un phénotype particulier. Des marques épigénétiques vont modifier l'ADN et créer une empreinte transmissible et réversible.

Les **divisions cellulaires asymétriques** sont également un des mécanismes clefs pour assurer la diversité cellulaire. C'est un principe universel conservé des procaryotes aux vertébrés. La division cellulaire a pour finalité de répliquer la cellule mère en deux cellules filles contenant la même information génétique. Cependant leurs destins cellulaires peuvent être identiques si la division est symétrique, ou distincts de par leur devenir prolifératif ou différenciatif, leur taille et/ou leur destin cellulaire, si la division est asymétrique.

L'asymétrie d'une division cellulaire peut être la conséquence d'une exposition différente des cellules filles à des signaux **extrinsèques** de leur environnement, ou à des échanges



intercellulaires (**figure 4**). Le microenvironnement des cellules souches constitue leur niche, composée de plusieurs signaux, comme la voie Notch, par exemple, requise pour leur autorenouveau (Koch *et al.* 2013). Des morphogènes, tels que BMP (*bone morphogenic protein*), Wnt (*wingless*), Shh (*sonic hedgehog*) et Egf (*epidermal growth factor*) peuvent être sécrétés dans le milieu extracellulaire et influencer le destin cellulaire de chacune des cellules filles (Morrison et Spradling 2008). Dans ces divisions, l'asymétrie s'acquiert après la division de la cellule mère. Ces divisions sont avant tout symétriques (**figure 4**), et ne seront pas couvertes dans cette thèse. La revue de Morrison et Spradling publiée en 2008 répertorie les mécanismes nécessaires au maintien du potentiel des cellules souches adultes et au cours du développement, dont la composition de leur niche (Morrison et Spradling 2008).

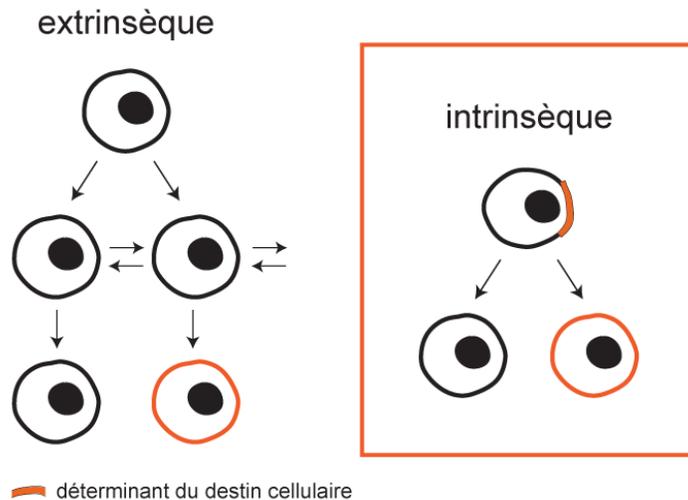


Figure 4. Les divisions cellulaires asymétriques induites par des signaux extrinsèques et intrinsèques.

Les divisions cellulaires asymétriques permettent de générer la diversité cellulaire au cours du développement. La division cellulaire asymétrique induite par des signaux extrinsèques (à gauche) produira deux cellules différentes suite à l'influence de signaux provenant de l'environnement de la cellule mère ou des cellules filles. La cellule fille noire diffère de la cellule fille orange par l'expression d'un, ou plusieurs, déterminant du destin cellulaire (orange). La division cellulaire asymétrique induite par des signaux intrinsèques (à droite) produira deux cellules différentes suite à l'héritage différentiel d'un, ou plusieurs, déterminant du destin cellulaire (orange).



Cette thèse est consacrée à la deuxième voie régulatrice d'une division cellulaire asymétrique, qui est intrinsèque (**figure 4**). Plusieurs modèles animaux ont permis de déterminer **trois étapes intrinsèques essentielles** à la division cellulaire asymétrique (**figure 5**). Dans un premier temps, la cellule mère se polarise en fin d'interphase et en début de prophase (**figure 5A**). L'établissement de cet axe de polarité est essentiel à la localisation asymétrique des déterminants de l'identité cellulaire, qui correspond à la deuxième étape (**figure 5B**). Enfin, les déterminants du destin cellulaire seront distribués asymétriquement entre les deux cellules filles selon l'orientation de la division, relative à l'axe de polarité (**figure 5C**). Les deux cellules filles adopteront alors une destinée distincte.

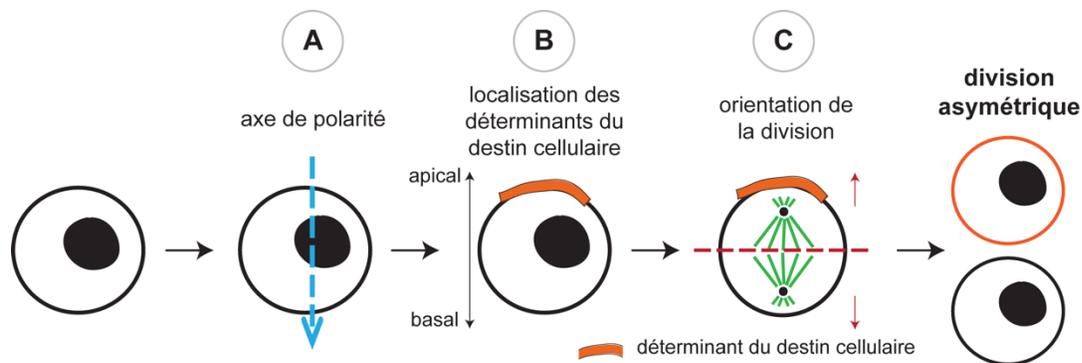


Figure 5. Les trois étapes intrinsèques essentielles à la division cellulaire asymétrique.

(A) La cellule mère (noire) se polarise selon un axe de polarité (bleu). (B) Cet axe détermine la position des pôles apical et basal. Les déterminants du destin cellulaire (orange) sont localisés asymétriquement dans la cellule ou à la membrane, relativement à l'axe de polarité. (C) L'orientation de la division est relative à l'axe de polarité. Les déterminants du destin cellulaire sont distribués symétriquement ou asymétriquement selon l'orientation de la division. La cellule fille qui hérite du déterminant cellulaire (orange) sera différente de sa cellule sœur (noire).

II. Les débuts de la division cellulaire

Le mot mitose vient du grec *mitos* qui signifie "filament", utilisé par l'anatomiste allemand Walther **Flemming** (1843-1905) dans les années 1880, pour décrire les chromosomes observés au début de la mitose, comme de longs filaments qui partent du noyau des cellules de mollusques fixées et colorées (**figure 6A**) ((Paweletz 2001) issu de Flemming 1882). Il observe



que les chromosomes s'alignent au centre, lors d'une phase qui sera plus tard appelée la métaphase.

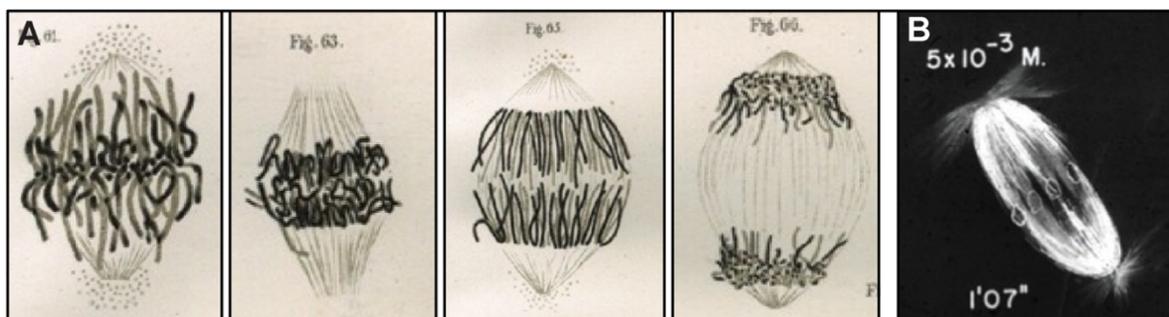


Figure 6. Les premières représentations de la cellule en mitose.

(A) Dessins des mouvements des chromosomes, déduits par Flemming. © Nature Publishing Group Paweletz (Paweletz 2001). Tous droits réservés. (B) Photo du fuseau mitotique de *Chaetopterus*, arrêté en métaphase. Image capturée une minute et sept secondes (1'07") après l'exposition à 5×10^{-3} M de colchicine, dans de l'eau de mer, par Inoué en 1952 (Inoue 2008).

Puis en 1891, Flemming remarque les **centrosomes**, comme deux structures localisées aux pôles opposés de la cellule en division, entre lesquels se situe le fuseau mitotique (Rusan et Peifer 2007). Le fuseau mitotique est composé de **microtubules**, qui sont le support du déplacement des chromatides vers les pôles opposés de la cellule lors de l'anaphase (**figure 6A**). Les centrosomes sont composés de deux centrioles perpendiculaires, qui sont le siège de l'organisation des microtubules (Nigg et Stearns 2011). Ils sont localisés au cortex cellulaire apical en interphase.

Les microtubules interpolaires relient les centrosomes entre eux, les kinétochoriens associent chaque chromatide aux centrosomes ; et les microtubules astraux, lesquels seront cités dans cette thèse, s'étendent des centrosomes au cortex cellulaire (Glotzer 2009). En 1984, Marc Kirschner et Tom Mitchison décrivent leur instabilité dynamique, alors qu'ils oscillent en permanence entre une phase de croissance et de contraction.

En 1884, Oscar **Hertwig** découvre qu'en appliquant des forces mécaniques sur des cellules d'un embryon d'oursin de mer, la division se fait par défaut au centre de la cellule et



parallèle à l'axe le plus long. Il propose ainsi que la géométrie de la cellule joue un rôle dans le contrôle de l'orientation de la division, dont naquit la "règle Hertwig" (Hertwig 1891).

En 1905, dans des embryons d'animaux marins, les ascidies, **Conklin** observe pour la première fois, une corrélation entre l'orientation de la division et l'identité ou la taille des cellules filles (Conklin 1905). Cette étude suggère que les acteurs de la polarité cellulaire sont liés aux régulateurs de la position du fuseau mitotique (Conklin 1905). Conklin propose alors que l'orientation de la division dépend d'un mécanisme intrinsèque et non externe à la cellule (Conklin 1905).

Plus d'un siècle plus tard, la règle Hertwig est montrée dans des cellules de mammifères en culture par O'Connell et Wang (O'Connell et Wang 2000). Même si la règle Hertwig se vérifie dans de nombreux cas, la forme de la cellule ne suffit pas systématiquement pour définir l'orientation de la division, la polarité cellulaire est également capitale dans la régulation du sens de la division (Minc *et al.* 2011).

Dans les années 1950-1960, les progrès de la microscopie permettent au scientifique japonais Shinya **Inoué** de publier pour la première fois des images de cellules en division filmées en temps réel (**figure 6B**) (Inoue 2008) Inoué et Dan 1951).

Les divisions cellulaires asymétriques ont principalement été caractérisées dans des **modèles animaux invertébrés**, comme le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) et la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* (*Drosophile*). Ces études ont permis d'identifier plusieurs protéines et mécanismes clefs, conservés de la levure aux vertébrés, qui permettent aux cellules de se diviser asymétriquement en alliant la polarité corticale à l'orientation du fuseau mitotique (Siller et Doe 2009).

Dans le cadre de cette thèse, les recherches sont axées sur l'étape de régulation de **l'orientation du fuseau mitotique**, qui permet le partage du matériel génétique de la cellule mère aux deux cellules filles. Si ce mécanisme est perturbé, le devenir des cellules filles et leur position sont affectés, cela peut conduire à la formation de tumeurs et des malformations développementales (Fish *et al.* 2006, Knoblich 2010, Quyn *et al.* 2010, Noatynska *et al.* 2012, Bergstralh et St Johnston 2014).



III. Modèle de la rétine

Le cortex cérébral des vertébrés est beaucoup étudié pour décrypter les mécanismes de régulation des divisions asymétriques. Dans cette thèse, et plus généralement au laboratoire, nous étudions un modèle appartenant au système nerveux central plus accessible et avec une organisation plus simple que le cortex : le modèle de la **rétine de souris en développement**, qui sera décrit dans la deuxième partie de l'introduction.

La rétine neurale est un système modèle idéal pour étudier la spécification du destin cellulaire et la production de la diversité cellulaire dans le système nerveux central (Cayouette *et al.* 2006, Bassett et Wallace 2012). Elle présente **plusieurs avantages** : anatomiques d'une part, comme son accessibilité en dehors de la boîte crânienne et son organisation simple d'autre part, stratifiée en trois couches de seulement six types de neurones et un type cellulaire glial principal, chacun identifiable par leur localisation, leur morphologie et l'expression de marqueurs moléculaires spécifiques et aisément quantifiables (Haverkamp et Wassle 2000, Hatakeyama et Kageyama 2004, Ohsawa et Kageyama 2008). L'un des plus grands défis dans l'étude des vertébrés et des mammifères, est de réaliser des expériences à l'échelle d'une seule cellule génétiquement modifiée, pour savoir si le comportement de la cellule est une conséquence directe de l'altération du gène. Or la rétine embryonnaire peut être cultivée en explants pendant des semaines, ce qui permet d'étudier le lignage d'un seul progéniteur suite à l'infection d'un rétrovirus. En explants, il est ainsi possible d'observer l'effet d'une délétion clonale dans un progéniteur individuel ; ou encore d'étudier les processus développementaux de souris mutantes létales ; ou de filmer des progéniteurs rétiniens en division et en temps réel.

IV. Modes de divisions cellulaires

Les progéniteurs rétiniens, ou neuraux, ont plusieurs modes de divisions qui ont été déduits d'analyses clonales, suite à une injection de rétrovirus dans des explants de rétines de rats ou de cerveaux de rats et de poulets (Turner et Cepko 1987, Gray *et al.* 1988, Price et



Thurlow 1988). D'autres études ont montré des divisions enregistrées en temps réel dans des explants de rétines de rat ou de tranches de cerveaux de rats, souris et furets (Chenn et McConnell 1995, Noctor *et al.* 2002, Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005). Ces différents modes de divisions cellulaires sont aussi observés *in vitro*, dans des cultures de progéniteurs corticaux (Qian *et al.* 1998, Qian *et al.* 2000, Shen *et al.* 2002).

Il existe **cinq modes de divisions cellulaires** différents en fonction du devenir des cellules filles, retrouvés dans plusieurs neuroépithéliums stratifiés (**figure 7**) (Gotz et Huttner 2005, Simons et Clevers 2011). Les divisions cellulaires peuvent être prolifératives ou différenciatives ou les deux, asymétriques ou symétriques. Les divisions symétriques prolifératives, dites d'autorenouveaulement, apparaissent tôt dans le développement rétinien et génèrent deux progéniteurs identiques entre eux et à la cellule mère, pour accroître leur population (Cayouette *et al.* 2001, Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005). Plus tard les divisions symétriques terminales produisent deux neurones postmitotiques identiques. La majorité des progéniteurs rétiniens tardifs se divisent de cette façon en formant deux photorécepteurs (Turner et Cepko 1987, Cayouette *et al.* 2001). Les divisions asymétriques prolifératives génèrent deux progéniteurs avec un potentiel de prolifération ou de différenciation distinct. Elles peuvent également générer un progéniteur plus un neurone postmitotique. Les divisions asymétriques terminales assurent la diversité cellulaire en générant deux neurones postmitotiques différents. Elles apparaissent dans les stades tardifs de la rétinogenèse, soit à P0, le premier jour postnatal (P) (Cayouette *et al.* 2001, Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005).

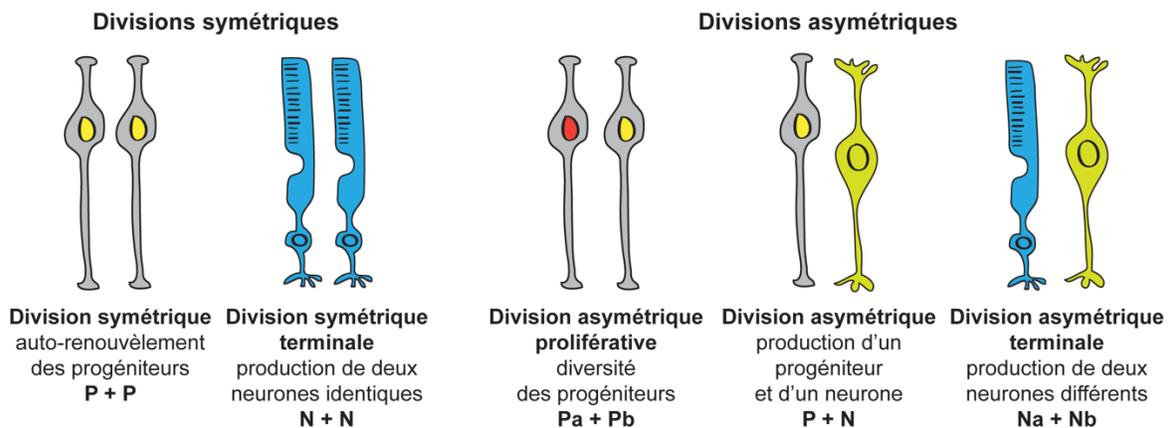


Figure 7. Les cinq modes de divisions cellulaires dans le système nerveux.



Précocement, les divisions symétriques permettent l'autorenouveau des progéniteurs en formant deux progéniteurs (gris-jaune) identiques (P+P). Plus tard les divisions symétriques terminales produisent deux neurones (bleu) identiques (N+N). Les divisions asymétriques prolifératives génèrent deux progéniteurs (gris-jaune et gris-rouge) différents (Pa+Pb). Les divisions asymétriques peuvent générer un progéniteur (gris-jaune) plus un neurone (vert) postmitotique (P+N). Les divisions asymétriques terminales produisent deux neurones (bleu et vert) différents (Na+Nb) et assurent la diversité cellulaire.

V. Les trois étapes d'une division cellulaire asymétrique intrinsèque

Les principaux modèles animaux étudiés pour comprendre les mécanismes de régulation des divisions cellulaires asymétriques évoqués dans cette thèse, sont le zygote de *C. elegans*, le système nerveux de la *Drosophila* ; l'épiderme, les neuroépithéliums du cortex cérébral et de la rétine de souris en développement.

V. 1. Mise en place de la polarité

La première étape essentielle pour conduire à une division cellulaire asymétrique est la polarisation de la cellule, qui permet de définir deux pôles opposés. La polarité cellulaire est fondamentale pour de nombreuses fonctions biologiques très variées.

Les **protéines *partitioning defect* (PAR)** sont les principales régulatrices de la polarité cellulaire. Découvertes dans les années 1980 comme étant impliquées dans la mortalité précoce d'embryons *C. elegans*, six mutations létales causent une symétrie des premières divisions cellulaires du zygote, normalement asymétriques (Kemphues *et al.* 1988). C'est la mauvaise répartition des déterminants cytoplasmiques qui engendre cette symétrie, d'où le nom de PAR pour *partitioning defect* ou "défaut de répartition".

Les protéines PAR ont été découvertes lors de cribles d'identification des mutations dans l'embryon *C. elegans* (Kemphues *et al.* 1988). Il existe six gènes *Par*, nommés *Par1* à *Par6*. **Conservés au cours de l'évolution**, ils établissent et maintiennent la polarité cellulaire, et par là même, l'asymétrie cellulaire. Les protéines au domaine PDZ, PAR3 et PAR6 forment le complexe de polarité avec la protéine kinase *atypical protein kinase C* (aPKC) (Wodarz 2002).



Dans le zygote de *C. elegans*, comme dans l'ovocyte de *Drosophile*, les protéines PAR établissent l'axe de **polarité antéro-postérieure** (Kemphues *et al.* 1988, Pellettieri et Seydoux 2002). PAR3, PAR6 et aPKC sont localisées au cortex cellulaire antérieur (Etemad-Moghadam *et al.* 1995, Watts *et al.* 1996, Tabuse *et al.* 1998, Hung et Kemphues 1999, Cuenca *et al.* 2003) (**figure 8**). Tandis que PAR1, PAR2 et *lethal giant larvae* (LGL) sont au cortex cellulaire postérieur du nématode (Guo et Kemphues 1995, Boyd *et al.* 1996, Gonczy 2008) (**figure 8**). C'est la phosphorylation réciproque des protéines PAR qui établit et maintient leur localisation et la limite entre le cortex cellulaire antérieur et postérieur. PAR1 phosphoryle PAR3, tandis que la protéine aPKC phosphoryle PAR2 et LGL (Beatty *et al.* 2010, Hao *et al.* 2010, Hoege *et al.* 2010).

La première division cellulaire du **zygote** *C. elegans* génère deux cellules filles de taille et de destin différents (**figure 8**) (Gonczy 2008). La plus grosse cellule est le blastomère antérieur, nommé AB, qui donnera l'ectoderme, tandis que la petite postérieure, nommée P1, se différenciera en cellules germinales du méso-endoderme (Cheng *et al.* 1995, Gonczy 2003) (**figure 8**).

Dans le système nerveux central embryonnaire de la *Drosophile*, les progéniteurs ou **neuroblastes** se divisent asymétriquement. Ils se renouvellent en un neuroblaste plus grand que la cellule-sœur, appelée la cellule ganglionnaire mère basale (GMC) qui produira des neurones et des cellules gliales (Doe 2008, Sousa-Nunes *et al.* 2010) (**figure 8**). Les neuroblastes embryonnaires se divisent asymétriquement selon l'axe apico-basal, grâce à la polarité héritée du neuroépithélium. L'homologue de PAR3 chez la *Drosophile*, BAZOOKA (BAZ) (**tableau I**), établit la polarité du neuroépithélium en s'associant à PAR6 et aPKC, ils forment le complexe de polarité (Wodarz *et al.* 1999, Petronczki et Knoblich 2001, Betschinger *et al.* 2003, Rolls *et al.* 2003). En interphase et au début de prophase, le complexe BAZ-PAR6-aPKC est localisé dans la partie apicale de la cellule (**figure 8**). La protéine *Rho GTPase* CDC42 agit en aval de BAZ, et active le complexe BAZ-PAR6-aPKC en se liant avec PAR6, qui à son tour recrute aPKC (Atwood *et al.* 2007, Goldstein et Macara 2007). Comme dans *C. elegans*, le complexe PAR reste polarisé, grâce à la phosphorylation d'aPKC inhibée par LGL au niveau du cortex cellulaire basal (Lee *et al.* 2006). Tandis qu'au niveau apical, aPKC phosphoryle et inactive



LGL, ce qui favorise la formation de la membrane apicale et des jonctions cellulaires (Hutterer *et al.* 2004). Les protéines PAR et CDC42 contrôlent la polarité cellulaire en induisant des changements dans le cytosquelette et en établissant les jonctions cellulaires (Goldstein et Macara 2007). Elles sont responsables de la stabilité des jonctions adhérentes, PAR3 est retrouvée en particulier dans les jonctions serrées (Martin-Belmonte *et al.* 2007, Harris et Tepass 2008). PAR3 est décrite en amont du complexe de polarité suite à une expérience de perte de fonction chez la *Drosophila*, qui entraîne la disparition de PAR6 et aPKC de la membrane, tandis que PAR3 reste polarisée en absence de PAR6 ou aPKC (Rolls *et al.* 2003).

<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	Vertébrés	Caractéristique
PAR3	BAZOOKA	PAR3/PARD3	domaine PDZ
PAR6	PAR6	PAR6	domaine PDZ
PKC-3	aPKC	aPKC	domaine PDZ
	NUMB	mNUMB	domaines PTB et PRR
	PROS	PROX1	facteur de transcription à homéodomaine
Gαo	Gαo et Gαi	Gαi	protéine G
GPR1/2	PINS	LGN/GPSM2	domaines GoLoco et TPR
	AGS3	AGS3/GPSM1	domaines GoLoco et TPR
LIN-5	MUD	NuMA	<i>coiled-coil</i>
	INSC	mINSC	répétitions amarillo

Tableau I. Homologues et caractéristiques des protéines de polarité, d'orientation du fuseau mitotique ou des déterminants cellulaires chez *C. elegans*, la *Drosophila* et les vertébrés.

Chez les mammifères, le **cortex cérébral, la rétine et l'épiderme** sont composés de plusieurs couches organisées sous forme d'un épithélium stratifié. Les noyaux des progéniteurs en division sont observés juxtant la couche cellulaire la plus apicale, soit la zone ventriculaire dans le cerveau, ou la membrane apicale rétinienne juxtaposée à l'épithélium pigmenté rétinien. Dans l'épiderme, les progéniteurs se divisent au niveau de la membrane qui sépare le derme de l'épiderme.

Les progéniteurs neuroépithéliaux sont polarisés dans l'**axe apico-basal**, grâce à la localisation du complexe PAR3-PAR6-aPKC au domaine apical (**figure 8**). Les protéines PAR



influencent la spécification du destin cellulaire lors des divisions asymétriques et restent exprimées pour la plupart dans les cellules différenciées aux stades adultes (Lechler et Fuchs 2005). En l'absence de *Par3*, les progéniteurs corticaux sortent du cycle cellulaire et commencent leur différenciation neuronale. La surexpression de PAR3 et PAR6 augmente le nombre de divisions symétriques prolifératives et ainsi le nombre de progéniteurs (Costa *et al.* 2008). aPKC est un déterminant clef pour la mise en place du domaine apical, si sa localisation cortico-apicale est perdue, celle de LGN est aléatoire, voire perdue (Lechler et Fuchs 2005).

En plus du complexe PAR, **trois autres groupes** de protéines sont impliqués dans la polarité épithéliale et/ou neuronale qui conduit à des divisions asymétriques : la polarité planaire (**PCP**) avec les protéines *frizzled* (FZ) et *dishevelled* (DSH) ; la polarité induite par des protéines suppresseurs de tumeurs *discs-large* (**DLG**), LGL et *scribble* (SCRB) ; ou celle *via* les protéines **CRUMB** (CRB), STARDUST (SDT)/*protein associated with lin seven* (PALS1) et *protein associated with tight junctions* (PATJ) (Ohshiro *et al.* 2000, Peng *et al.* 2000, Siegrist et Doe 2005, Assemat *et al.* 2008, Segalen *et al.* 2010, Johnston *et al.* 2013). Ces trois complexes interagissent avec les PAR pour établir les surfaces apicales et basales des cellules épithéliales de *Drosophile* (Bilder *et al.* 2003, Tanentzapf et Tepass 2003).

Chez la *Drosophile*, les régulateurs moléculaires de la PCP ont été identifiés dans le développement de l'œil et de l'aile. Ces mêmes régulateurs sont impliqués dans le contrôle de l'orientation de la division. Les précurseurs d'organes sensoriels (**SOP**) de la mouche permettent d'étudier la régulation de la division cellulaire asymétrique dont l'orientation dépend de la PCP (Roegiers et Jan 2004). Chaque SOP se divise asymétriquement plusieurs fois pour former les organes sensoriels du système nerveux périphérique (Gho *et al.* 1999) (**figure 8**). Les SOP délaminent à partir d'un épithélium polarisé et se divisent asymétriquement en pIIa postérieure et pIIb antérieure, qui vont respectivement produire deux cellules externes, de soie et du socle, ou des cellules internes aux organes sensoriels, un neurone, une cellule gliale ou une cellule de la gaine (**figure 8**). Ils se divisent asymétriquement, mais de façon planaire (**figure 8**). La revue Segalen et Bellaïche 2009 décrit en détail le mécanisme de PCP dans la régulation de l'orientation de la division cellulaire (Segalen et Bellaïche 2009).



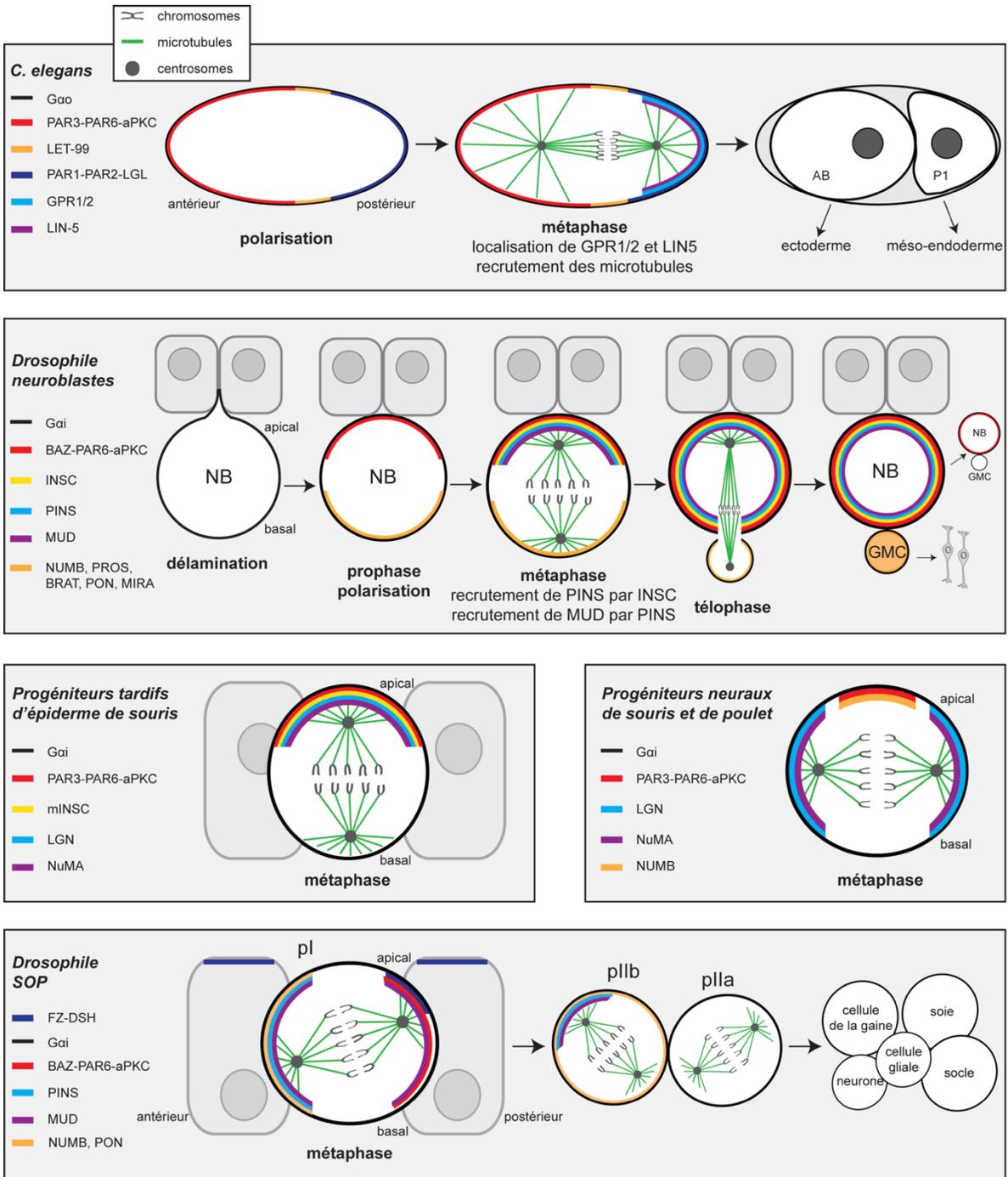


Figure 8. Régulation des divisions cellulaires asymétriques dans différents modèles.
(*C. elegans*) Les protéines PAR établissent l'axe de polarité antéro-postérieure. PAR3, PAR6 et aPKC sont localisées au cortex cellulaire antérieur, et PAR1, PAR2 et LGL sont au cortex cellulaire postérieur du nématode. LET-99 est localisée au cortex cellulaire, à l'endroit du clivage, elle inhibe GPR-1/2. L'orientation du fuseau mitotique est relative à l'axe de polarité. Les sous-unités Gao sont localisées tout



autour du cortex cellulaire. Le complexe GPR-1/2 et LIN-5 est enrichi au cortex postérieur. La première division cellulaire du zygote *C. elegans* génère deux cellules filles de taille et de destin différents : une cellule antérieure plus grosse (AB) qui se différenciera en cellules de l'ectoderme, et une petite cellule postérieure (P1) qui formera le méso-endoderme. **(Drosophile, neuroblastes)** Les neuroblastes de *Drosophile* délaminent du neuroépithélium. Ils sont polarisés dans l'axe apico-basal par la localisation cortico-apicale du complexe de polarité BAZ-PAR6-aPKC. Les déterminants cellulaires NUMB, PROS, BRAT, PON et MIRA sont enrichis au pôle opposé. Gai est localisée tout autour du cortex cellulaire. INSC est recrutée et maintenue à la membrane apicale par son interaction avec BAZ et aPKC. Elle recrute ensuite PINS au cortex apical, qui se lie à son tour à MUD qui est associée aux microtubules. Des forces sont déployées du cortex cellulaire aux microtubules astraux, pour orienter le fuseau mitotique. La division verticale asymétrique donnera un neuroblaste (NB) plus grand que la cellule-sœur, la cellule ganglionnaire mère basale (GMC) qui héritera des déterminants cellulaires et produira des neurones et des cellules gliales. Le neuroblaste continuera à s'autorenouveler. **(Progéniteurs tardifs d'épiderme de souris)** Tôt dans le développement, les progéniteurs épidermaux se divisent à l'horizontale et augmentent la surface de l'épiderme. Plus tard, l'orientation devient verticale, grâce à la polarité apico-basale conférée par la localisation apicale du complexe de polarité PAR3-PAR6-aPKC. Comme dans les neuroblastes de *Drosophile*, mINSC est recrutée et maintenue à la membrane apicale par son interaction avec PAR3 et aPKC. Elle recrute ensuite LGN au cortex apical, qui s'associe à NuMA, qui recrute les microtubules astraux sur lesquels des forces sont déployées pour orienter le fuseau mitotique à la verticale. **(Progéniteurs neuraux de souris et de poulet)** Les progéniteurs du tube neural de souris et de poulet sont polarisés dans l'axe apico-basal par la localisation cortico-apicale du complexe de polarité PAR3-PAR6-aPKC. Le déterminant cellulaire mNUMB est également enrichi au domaine apical. Gai est localisée tout autour du cortex cellulaire. Tandis que le complexe LGN-NuMA est exprimé au cortex latéral, ce qui positionne le fuseau mitotique à l'horizontale et conduit à une division planaire. **(Drosophile, SOP)** L'orientation des précurseurs d'organes sensoriels dépend de la PCP, induite par les signaux de FZ-DSH. L'orientation apico-basale du fuseau mitotique dépend de la localisation de PINS-MUD au cortex antérieur, et l'orientation antéro-postérieure dépend de la localisation de FZ-DSH au cortex apico-postérieur. Le complexe de polarité BAZ-PAR6-aPKC est localisé au cortex cellulaire postérieur avec MUD. Les déterminants cellulaires NUMB et PON sont localisés au cortex cellulaire antérieur. Les SOP vont former les organes sensoriels du système nerveux périphérique de *Drosophile*. La cellule mère (pI) se divise asymétriquement de façon planaire en pIIa postérieure et pIIb antérieure, qui vont respectivement produire deux cellules externes, de soie et du socle, ou des cellules internes aux organes sensoriels, un neurone, une cellule gliale ou une cellule de la gaine. Modifié de (Lu et Johnston 2013, Dewey *et al.* 2015, di Pietro *et al.* 2016).

Les **protéines PAR** établissent la polarité cellulaire et sont également impliquées dans la distribution asymétrique des déterminants du destin cellulaire, ainsi que dans la régulation de la position du fuseau mitotique, qui déterminera l'orientation de la division cellulaire. Chez *C. elegans*, elles influencent aussi l'asymétrie des forces exercées sur les pôles du fuseau mitotique (Kemphues *et al.* 1988, Etemad-Moghadam *et al.* 1995, Sawa 2012). La perte de fonction de



PAR3 engendre une perte de polarité, dont découle des défauts d'orientation du fuseau mitotique (Schober *et al.* 1999, Wodarz *et al.* 1999). Tandis que la perte de PAR6, aPKC ou des protéines basales n'affecte pas l'orientation du fuseau mitotique (Schober *et al.* 1999, Wodarz *et al.* 1999, Rolls *et al.* 2003).

V. 2. Distribution des déterminants de l'identité cellulaire

Dans les neuroblastes de *Drosophila*, le complexe BAZOOKA-PAR6-aPKC assure la localisation asymétrique des déterminants du destin cellulaire **NUMB**, le facteur de transcription à homéodomaine *Prospero* (**Pros**), le suppresseur de tumeur *Brain tumor* (**Brat**) et les protéines adaptatrices *partner of NUMB* (**PON**) et **MIRANDA** (**MIRA**) (Rhyu *et al.* 1994, Hirata *et al.* 1995, Knoblich *et al.* 1995, Spana et Doe 1995, Lu *et al.* 1998, Shen *et al.* 2002, Bello *et al.* 2006, Betschinger *et al.* 2006, Lee *et al.* 2006) (**figure 8**). La protéine *coiled-coil* PON, et MIRA assurent la distribution asymétrique de NUMB ou de PROS et BRAT, respectivement dans la cellule mère. En absence de PON et MIRA, NUMB, PROS et BRAT sont délocalisées. BRAT est un activateur de l'expression de PROS. En absence de BRAT, PROS n'est plus exprimée. La surexpression de PROS peut contrecarrer l'absence de BRAT (Bello *et al.* 2006, Betschinger *et al.* 2006, Lee *et al.* 2006). Elles répriment toutes deux le destin cellulaire des neuroblastes et favorisent la sortie du cycle cellulaire des cellules ganglionnaires mère basales de *Drosophila*. En leur absence, les deux cellules filles deviennent des neuroblastes et le tissu a une croissance anormale (Li et Vaessin 2000, Choksi *et al.* 2006). En plus des protéines, les ARNm de PROS et INSC par exemple, sont ségrégés de façon différentielle (Li *et al.* 1997, Broadus *et al.* 1998, Hughes *et al.* 2004, Medioni *et al.* 2012). En l'absence de BAZOOKA, NUMB, MIRA et PROS sont localisées tout autour du cortex cellulaire (Schober *et al.* 1999, Wodarz *et al.* 1999).

NUMB a été découvert dans le système nerveux périphérique de la *Drosophila* (Uemura *et al.* 1989). Des expériences de perte ou gain de fonction montrent qu'il est nécessaire et suffisant pour assurer la diversité cellulaire des SOP. La surexpression ou la perte de fonction de *numb* dans les SOP, engendrent une division symétrique avec deux pIIb ou deux pIIa respectivement (Rhyu *et al.* 1994). Le gain de fonction de l'homologue de NUMB chez les mammifères, mNUMB (**tableau I**), compense le phénotype du mutant *Numb* chez la



Drosophile, suggérant une conservation de sa fonction (Zhong *et al.* 1996). mNUMB et son homologue murin NUMB-like, sont constitués de domaines *phospho tyrosine binding domain* (PTB) et *proline rich region* (PRR). Notre équipe a étudié le rôle de *mNumb* dans les **progéniteurs rétiniens**. Son inactivation tardive favorise la production des divisions symétriques terminales, composées de deux photorécepteurs, au détriment des divisions asymétriques terminales, démontrant un rôle essentiel pour *mNumb* dans la production des divisions asymétriques terminales dans la rétine (Kechad *et al.* 2012).

Dans les neuroblastes embryonnaires de *Drosophile* en division, le complexe de polarité PAR, localisé dans la partie apicale, assure le transport des déterminants cellulaires qui s'accumulent du côté basal, *via* LGL et les myosines. En mitose, NUMB est **localisée asymétriquement** à la membrane apicale des progéniteurs rétiniens de souris (Kechad *et al.* 2012), de rat (Cayouette *et al.* 2001, Dooley *et al.* 2003), de poisson-zèbre (Das *et al.* 2003), des progéniteurs neuraux de furet (Chenn et McConnell 1995) et des progéniteurs du cerveau antérieur de souris (Zhong *et al.* 1996) (**figure 8**). Selon l'orientation de la division cellulaire, une seule ou les deux cellules filles hériteront de NUMB (**figure 9**) et des autres déterminants cellulaires, et cette ségrégation influence le destin cellulaire.

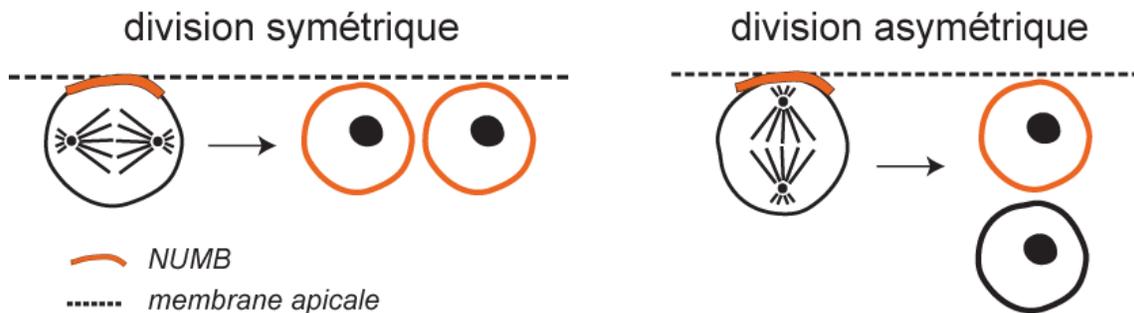


Figure 9. Répartition du déterminant cellulaire NUMB/mNUMB.

Le déterminant du destin cellulaire NUMB/mNUMB est localisé au pôle apical de la cellule en division, dans les progéniteurs rétiniens et neuraux de souris par exemple. Selon l'orientation de la division cellulaire, il sera réparti symétriquement ou asymétriquement dans les cellules filles.

Dans les neuroblastes de *Drosophile* par exemple, la division apico-basale conduit à deux cellules filles différentes, avec un héritage apical de aPKC qui favorise



l'autorenouveaulement du neuroblaste, et un héritage basal du complexe de différenciation MIRA-PROS-BRAT-NUMB-PON dans la GMC (**figure 8**). NUMB inhibe la voie Notch par endocytose *via* son domaine PTB (Spana *et al.* 1995, Guo *et al.* 1996, Verdi *et al.* 1996, Zhong *et al.* 1996). L'inhibition de Notch dans la cellule fille héritant de NUMB, favorise sa différenciation neuronale (Rhyu *et al.* 1994, Cayouette *et al.* 2001, Cayouette 2003, Schweisguth 2004, Le Borgne *et al.* 2005, Kechad *et al.* 2012).

Numb-like n'est pas réparti de façon asymétrique et la souris mutante n'a pas de phénotype particulier, mais il compense la perte de fonction de *mNumb* (Petersen *et al.* 2002, Huang *et al.* 2005). La souris mutante pour *mNumb* est létale au jour embryonnaire 10.5 (E10.5) à cause d'un défaut de fermeture du tube neural (Zhong *et al.* 1996, Zhong *et al.* 2000). La souris double mutante pour *Numb* et *Numb-like* a un phénotype encore plus sévère et meurt à E9.5 (Zhong *et al.* 2000, Zilian *et al.* 2001).

Il existe d'autres déterminants cellulaires protéiques, ARN, organelles, ou composants de la membrane, comme le domaine apical, ou bien encore les centrosomes (Medioni *et al.* 2012, Roubinet et Cabernard 2014).

V. 3. Orientation du fuseau mitotique

Pour permettre l'héritage asymétrique des déterminants cellulaires entre les deux cellules filles, la position du fuseau mitotique doit être coordonnée à la polarité corticale. Les mécanismes moléculaires régulant l'orientation de la division cellulaire sont pour la plupart conservés du nématode *C. elegans* et de la *Drosophila* aux vertébrés.

V. 3. 1. Définition du plan de la division cellulaire

Dans cette thèse, l'orientation de la division cellulaire est déterminée par l'**angle** mesuré entre l'axe du fuseau mitotique et la membrane apicale, classé en trois catégories, par tranche de 30 degrés (**figure 10**).

Si le fuseau mitotique est parallèle au plan du tissu, la **division cellulaire est dite planaire ou horizontale**. L'angle mesuré entre le fuseau mitotique et la membrane apicale est



entre 0 et 30 degrés (**figure 10A**). Tôt dans le développement de la rétine et de l'épiderme, la majorité des divisions sont horizontales et symétriques pour amplifier la population de progéniteurs (Cayouette *et al.* 2001, Cayouette 2003, Lechler et Fuchs 2005, Poulson et Lechler 2010, Williams *et al.* 2011). Dans le cortex cérébral des mammifères, la majorité des progéniteurs de la zone ventriculaire se divise à l'horizontale (Chenn et McConnell 1995).

À l'inverse, si le fuseau mitotique est perpendiculaire au plan du tissu, ou parallèle à l'axe apico-basal, la **division cellulaire est dite verticale ou apico-basale**, avec un angle entre 60 et 90 degrés (**figure 10A**). Pour la première fois en 1995, Chenn et McConnell ont observé et filmé des divisions verticales de progéniteurs chez les vertébrés, en étudiant le cortex cérébral de furet en développement (Chenn et McConnell 1995). Dès lors, ils suggèrent que ces divisions sont asymétriques et neurogéniques, tandis que les divisions horizontales sont symétriques et prolifératives. Ils montrent un **lien entre l'orientation et le destin cellulaire**, qui est au cœur de cette thèse. Dans l'épiderme de souris et dans la rétine, ces divisions verticales sont observées dans les phases tardives du développement (Cayouette *et al.* 2001, Cayouette 2003, Lechler et Fuchs 2005, Poulson et Lechler 2010, Williams *et al.* 2011). Cette orientation du fuseau mitotique conduit à une distribution asymétrique du déterminant NUMB (**figure 9**), qui inhibe la signalisation de Notch dans la cellule fille apicale, et conduit à deux cellules filles au destin cellulaire distinct.

Lorsque le fuseau mitotique est incliné, avec un angle de 30 à 60 degrés, ce sont des **divisions cellulaires obliques (figure 10A)**.

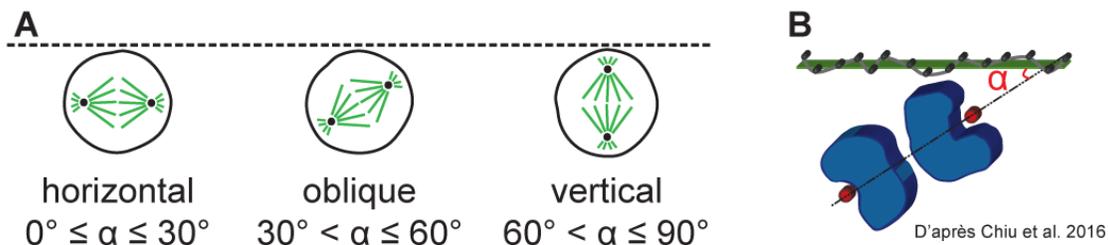


Figure 10. Catégories d'angles et mesure de l'orientation de la division cellulaire en trois dimensions.

(A) Exemple des trois catégories d'orientations de division cellulaire. Une division est dite planaire ou horizontale, lorsque l'angle formé entre le fuseau mitotique et la membrane apicale (ligne pointillée) est compris entre 0 et 30 degrés. La division est oblique avec un angle compris entre 30 et 60 degrés. La division est dite verticale ou apico-basale avec un angle compris entre 60 et 90 degrés. (B) Schéma



illustrant la mesure en trois dimensions de l'angle formé entre le fuseau mitotique, axe noir entre les deux centrosomes (rouges), et la membrane apicale (verte), dont les coordonnées en trois dimensions d'une quinzaine de points sont mesurées. L'angle α est mesuré par des calculs de trigonométrie réalisés automatiquement par un programme informatique *Matlab*.

Selon les études, les angles mesurés diffèrent et cela peut créer une confusion entre les termes. Il peut s'agir de l'angle de la division cellulaire, comme ci-dessus, ou de l'angle perpendiculaire, soit l'angle du plan de clivage.

Les **mesures d'angle** s'effectuent selon le protocole utilisé précédemment au laboratoire (Cayouette *et al.* 2001), en utilisant les coordonnées en **trois dimensions** des centrosomes et de la membrane apicale, analysées avec l'aide d'un programme informatique (MATLAB, Mathworks) et de formules mathématiques de trigonométrie (Juschke *et al.* 2014) (**figure 10B** ; méthodes pages 112-113).

Dans la **rétilne de poisson-zèbre**, l'orientation de la division cellulaire est aussi corrélée avec le destin cellulaire, mais dans un plan différent de l'axe apico-basal (Das *et al.* 2003, Poggi *et al.* 2005). Les progéniteurs se divisent symétriquement dans le sens centropériphérique, ou de façon asymétrique dans le plan de la circonférence (Poggi *et al.* 2005). Comme chez la souris, les divisions cellulaires changent d'orientation au cours du développement, avec une majorité de divisions symétriques au début, puis une réorientation dans l'axe de la circonférence et un devenir asymétrique (Das *et al.* 2003).

V. 3. 2. Régulation de l'orientation du fuseau mitotique

Première étape : recrutement de LGN au cortex cellulaire par G α i

Les principales protéines qui régulent la position du fuseau mitotique sont conservées du nématode aux vertébrés, comme les protéines G hétérotrimériques. La sous-unité **G α** peut se lier au GDP ou au GTP. Le facteur d'échange de guanine (GEF) échange le GDP par du GTP, ce qui active la protéine. La liaison G α GDP est stabilisée par des inhibiteurs de dissociation du nucléotide guanidique (GDI), et la protéine est alors inactive. Les protéines G α sont ancrées à



la membrane plasmique par myristoylation, c'est-à-dire que leurs groupes myristoyls sont insérés dans la bicouche lipidique (Du et Macara 2004, Morin et Bellaïche 2011).

Dans le zygote *C. elegans*, les sous-unités $G\alpha$ impliquées dans la division asymétrique sont GOA1 et GPA16 ; chez la *Drosophile* les homologues de **Gao** sont **Gao** et **Gai**, et **Gai** chez les vertébrés (**tableau I**) (Zwaal *et al.* 1996). Elles sont localisées tout autour du cortex cellulaire (**figure 8**), et permettent d'ancrer et de stabiliser à la membrane les protéines homologues de GPR1/2 chez *C. elegans*, soit **PINS** (*partner of inscutable*) chez la *Drosophile*, **LGN** (leucine-glycine-asparagine), aussi appelée **GPSM2** (*G-protein signaling modulator 2*), chez les vertébrés (Mochizuki *et al.* 1996, Gotta *et al.* 2003, Srinivasan *et al.* 2003) (**tableau I, figure 8**). GPR-1/2/PINS/LGN interagissent avec Gao et Gai seulement quand les $G\alpha$ sont liées au GDP (Schaefer *et al.* 2000, Willard *et al.* 2004). GPR-1/2/PINS/LGN agissent comme des GDI, en inhibant la dissociation des guanines des $G\alpha$, et sont nécessaires à la progression normale du cycle cellulaire (Kaushik *et al.* 2003, Willard *et al.* 2004, Afshar *et al.* 2005).

Le nom de **Lgn** vient des 10 répétitions des trois acides aminés, leucine, glycine et asparagine, dans la terminaison *N-ter* de la protéine. Il est aussi appelé **Gpsm2** parce que ce gène module l'activation de protéines G ; ou encore *Dfnb82* (*deafness, autosomal recessive 82*), qui vient du phénotype engendré par sa perte de fonction chez l'humain, soit une surdité non syndromique autosomique récessive. Il est identifié pour la première fois comme un interacteur de Gai, en 1996, par un crible biochimique en double hybride (Mochizuki *et al.* 1996). La même année, chez *C. elegans*, les protéines GPR-1/2 sont identifiées comme nécessaires à la première division cellulaire du zygote, par un crible génomique fonctionnel (Gonczy *et al.* 2000).

LGN a un homologue nommé **AGS3** (*activator of G protein signalling*) ou **GPSM1** (*G-protein signaling modulator 1*) (**tableau I**), observé pour la première fois dans la levure, par un crible de récepteurs activateurs des protéines $G\alpha$, d'où son nom (Takesono *et al.* 1999, Blumer *et al.* 2002). La protéine AGS3 est exprimée faiblement dans le cerveau de souris et absente dans la rétine adulte (Blumer *et al.* 2002, Nair *et al.* 2005). La souris mutante pour *Ags3* ne montre pas de phénotype particulier dans le cerveau (Blumer *et al.* 2008).



LGN est exprimée dans de nombreux tissus en développement et chez l'adulte. Dans le système nerveux central en développement, LGN est enrichie dans la zone ventriculaire qui contient les progéniteurs neuraux en prolifération (Blumer *et al.* 2002, Morin *et al.* 2007, Konno *et al.* 2008). Dans la rétine, LGN est exprimée dans les phases prolifératives du développement, et retrouvée chez l'adulte dans les segments internes des photorécepteurs, suggérant que LGN a différents rôles selon l'âge de l'animal (Kerov *et al.* 2005, Nair *et al.* 2005, Raji *et al.* 2008). Dans les cellules ciliées de la cochlée adulte, LGN est exprimée au niveau du cil primaire et est nécessaire pour son positionnement (Ezan *et al.* 2013, Tarchini *et al.* 2013).

Les protéines GPR-1/2/PINS/LGN interagissent avec les protéines $G\alpha$ via leurs motifs **GoLoco**, domaines de liaison et de régulation des protéines G (GPR) en *C-ter* (Parmentier *et al.* 2000, Schaefer *et al.* 2000). LGN et AGS3 contiennent quatre motifs GoLoco (**figure 11**), PINS en contient trois et GPR-1/2, un seul (Mochizuki *et al.* 1996, Yu *et al.* 2000, Srinivasan *et al.* 2003). Le nom GoLoco vient de la protéine GAP (*GTPase-activating protein*) LOCO, capable d'interagir avec *Gao* chez la *Drosophila*. La protéine LOCO a pour homologue RGS14 chez les vertébrés, et RGS7 chez *C. elegans* (Hess *et al.* 2004). Les domaines GoLoco de GPR-1/2/PINS/LGN stabilisent les protéines $G\alpha_i$ et $G\alpha_o$ sous forme $G\alpha_{GDP}$ et empêchent l'échange en $G\alpha_{GTP}$. La GAP RGS4 et la GEF RIC8 contrôlent l'interaction entre LGN et $G\alpha_i$, en modulant l'activité *GTPase* de $G\alpha_i$ (Afshar *et al.* 2004, Couwenbergs *et al.* 2004, David *et al.* 2005, Hampoelz *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005, Woodard *et al.* 2010).

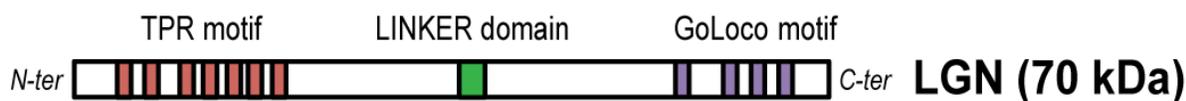


Figure 11. Structure de la protéine LGN.

La protéine LGN, d'un poids moléculaire de 70 kDa, est composée de quatre motifs GoLoco en *C-ter*, de sept motifs TPR en *N-ter* et d'un domaine LINKER entre les deux.

Les protéines homologues PINS et LGN, partagent une grande similarité de séquence, la surexpression de LGN chez la *Drosophila* peut se substituer à la fonction de PINS (Yu *et al.* 2003). La protéine LGN est absente du cortex cellulaire quand l'interaction entre LGN et $G\alpha_i$



est perturbée. Cependant, les protéines $G\alpha$ ne participent pas à la polarisation de GPR-1/2/PINS/LGN (Schaefer *et al.* 2000, Yu *et al.* 2000, Schaefer et Knoblich 2001).

Deuxième étape : polarisation de LGN

Dans le zygote *C. elegans* en division, GOA1/GPA16 sont tout autour du cortex cellulaire et recrutent GPR-1/2 (**figure 8**). Le complexe de polarité PAR3-PAR6-aPKC est au cortex cellulaire antérieur, PAR1 et PAR2 sont au pôle opposé (**figure 8**). Le complexe PAR3-PAR6-aPKC active la kinase caséine 1 (CSNK-1), qui inhibe la kinase PPK-1. En l'absence du complexe, CSNK-1 est inactive, PPK-1 s'accumule et elle permet l'enrichissement cortical postérieur de GPR-1/2 (Panbianco *et al.* 2008). En même temps, **LET-99**, située dans la partie corticale latérale inhibe GPR-1/2 (Park et Rose 2008, Krueger *et al.* 2010) (**figure 8**). En anaphase, trois domaines corticaux se distinguent avec peu de GPR-1/2 en antérieur, une absence latérale et un enrichissement postérieur (Krueger *et al.* 2010) (**figure 8**). Au niveau postérieur, GPR-1/2 se lie aux protéines homologues GOA1_{GDP} et GPA16_{GDP} (Gotta *et al.* 2003, Afshar *et al.* 2005).

Il en va de même dans les neuroblastes de *Drosophile* et dans l'épiderme de souris, les protéines $G\alpha$ _{GDP} sont ancrées à la membrane et maintiennent les protéines PINS/LGN au cortex cellulaire, par interaction avec leurs domaines **GoLoco** (Schaefer *et al.* 2000, Yu *et al.* 2000).

Lors de l'interaction entre GPR-1/2/PINS/LGN et $G\alpha$, elles s'activent (Colombo *et al.* 2003, Gotta *et al.* 2003, Srinivasan *et al.* 2003). Or, lorsque GPR-1/2/PINS/LGN est activée, la protéine a une **conformation ouverte** qui empêche ses domaines TPR (répétitions tétratricopeptides) en *N-ter* (**figure 11**) et GoLoco en *C-ter* d'interagir ensemble (Du et Macara 2004, Nipper *et al.* 2007, Gonczy 2008). Les domaines TPR sont ainsi libres de s'associer avec d'autres molécules. PINS/LGN contient sept domaines TPR (**figure 11**), GPR-1/2 en contiennent deux, ils permettent les interactions protéine-protéine (Mochizuki *et al.* 1996, Yu *et al.* 2000, Srinivasan *et al.* 2003).

Par un crible biochimique en double hybride, PINS est décrite pour la première fois dans les neuroblastes de *Drosophile*, comme interacteur de la protéine **INSCUETABLE** (INSC), en



l'an 2000 (Schaefer *et al.* 2000, Yu *et al.* 2000). Le rôle de PINS dans l'orientation du fuseau mitotique est découvert dans les divisions apico-basales des neuroblastes (Parmentier *et al.* 2000, Bellaïche et Schweisguth 2001). La protéine INSC est associée à la membrane plasmique spécifiquement pendant la mitose. Elle est essentielle pour la polarisation et stabilisation de PINS au cortex cellulaire. Initialement décrite pour sa localisation apicale et son rôle dans **l'orientation apico-basale** des neuroblastes de *Drosophila*, sa fonction est conservée chez les mammifères (Kraut *et al.* 1996, Schaefer *et al.* 2000, Yu *et al.* 2000). Son homologue **mINSC (tableau I)** est localisé au pôle apical des progéniteurs de l'épiderme de souris (**figure 8**), des progéniteurs corticaux (**figure 8**) et rétiniens pour contrôler la division apico-basale (Lechler et Fuchs 2005, Zigman *et al.* 2005, Postiglione *et al.* 2011).

INSC/mINSC est recrutée et maintenue à la membrane apicale grâce à son interaction avec BAZOOKA/PAR3 et aPKC (Schober *et al.* 1999, Wodarz *et al.* 1999, Wodarz *et al.* 2000, Izumi *et al.* 2004) (**figure 8**). Elle se lie ensuite à PINS/LGN *via* leurs domaines **TPR** laissés libres, les TPR3 et TPR7 chez les mammifères, permettant ainsi la localisation apicale de PINS/LGN (Kraut *et al.* 1996, Schaefer *et al.* 2000, Yu *et al.* 2000, Izaki *et al.* 2006, Knoblich 2008). Yuzawa *et al.* et Culurgioni *et al.* ont étudié en détail la structure moléculaire de l'interaction entre INSC et LGN (Culurgioni *et al.* 2011, Yuzawa *et al.* 2011, Zhu *et al.* 2011). INSC établit le lien entre la polarité corticale, avec BAZOOKA/PAR3, et une protéine impliquée dans l'orientation du fuseau mitotique, PINS/LGN (Bulgheresi *et al.* 2001, Lechler et Fuchs 2005, Zigman *et al.* 2005, Postiglione *et al.* 2011). INSC et PINS sont interdépendantes pour leur localisation apicale dans les neuroblastes. En absence d'INSC, PINS est localisée tout autour du cortex cellulaire, et en absence de PINS ou Gai, INSC est diffuse dans le cytoplasme de la cellule en division.

Des **progéniteurs rétiniens** en division ont été filmés en temps réel dans des explants de rétine (Zigman *et al.* 2005). En l'absence de mINSC, le nombre de divisions apico-basales diminue, celui des divisions horizontales augmente et cela influence le destin cellulaire. Les divisions symétriques prolifératives augmentent (Zigman *et al.* 2005). À l'inverse, la surexpression de INSC/mINSC produit plus de divisions apico-basales dans l'épiderme de souris



(Poulson et Lechler 2010, Williams *et al.* 2011), dans les cellules épithéliales de *Drosophile* (Kraut *et al.* 1996) ou dans le neuroépithélium des vertébrés (Konno *et al.* 2008).

Dans les **neuroblastes de *Drosophile***, en absence d'INSC, l'orientation du fuseau mitotique est aléatoire, ainsi que la localisation des déterminants cellulaires NUMB, PROS et leurs partenaires respectifs PON et MIRA, ce qui engendre des défauts d'identité cellulaire (Kraut *et al.* 1996, Wodarz *et al.* 1999, Schaefer *et al.* 2000, Rolls *et al.* 2003). La localisation apicale de PAR3 et aPKC est modifiée en l'absence de PINS ou Gai, ce qui affecte l'orientation du fuseau mitotique (Yu *et al.* 2006). La perte de PINS et PAR3 ensemble entraîne des défauts d'asymétrie, d'orientation du fuseau mitotique et produit deux cellules filles de la même taille (Cai *et al.* 2003, Fuse *et al.* 2003, Yu *et al.* 2006). Dans les **progéniteurs neuraux de souris**, l'absence de AGS3 perturbe drastiquement l'orientation du fuseau mitotique (Sanada et Tsai 2005). Tandis que dans l'épiderme de souris, son absence n'affecte pas la localisation de LGN, ni l'équilibre entre les divisions cellulaires horizontales et verticales (Williams *et al.* 2011).

Troisième étape : recrutement de NuMA au cortex cellulaire par LGN

Une fois que GPR-1/2/PINS/LGN et GOA1/GPA16/Gai_{GDP} sont stabilisées au cortex cellulaire apical, GPR-1/2/PINS/LGN est en conformation ouverte, qui laisse libre les domaines TPR d'interagir avec un nouveau partenaire protéique (Du et Macara 2004). Chez *C. elegans*, GPR-1/2 recrutent par liaison à ses domaines TPR, la protéine associée aux microtubules *coiled-coil* **LIN-5** (*spindle apparatus protein lin-5, abnormal cell LINEage*) ; PINS chez la *Drosophile* et LGN chez les vertébrés se lient aux homologues de LIN-5, soit **MUD** (*mushroom body defect*) et **NuMA** (*nuclear mitotic apparatus*) respectivement (Du *et al.* 2001, Gotta *et al.* 2003, Srinivasan *et al.* 2003, Du et Macara 2004, Bowman *et al.* 2006, Izumi *et al.* 2006, Siller *et al.* 2006) (**tableau I, figure 8**). Le nom de Mud vient des défauts causés dans le cerveau adulte des mutants *Drosophiles*, dans les régions responsables de la mémoire, les corps pédonculés ou *mushroom bodies*, à cause de leur forme de champignon.

Chez les vertébrés, **NuMA** est exprimée dans le noyau des cellules en interphase ; chez *C. elegans* et dans les neuroblastes de *Drosophile*, LIN-5/MUD sont corticales (Srinivasan *et al.* 2003, Du et Macara 2004, Bowman *et al.* 2006).



À partir de la **métaphase**, MUD/NuMA est exprimée aux centrosomes et aux pôles du fuseau mitotique (Siller *et al.* 2006). Elle est recrutée au cortex cellulaire par PINS/LGN (Seldin *et al.* 2013, Zheng *et al.* 2014), grâce à la phosphorylation d'une sérine de son domaine *coiled-coil*, par la kinase Warts de la voie de signalisation *Hippo* (Dewey *et al.* 2015). Dans des lignées cellulaires humaines, comme les HeLa et hTERT-RPE1, la phosphorylation de NuMA par la kinase mitotique centrosomale Aurora A est nécessaire pour sa localisation corticale (Gallini *et al.* 2016). En l'absence d'Aurora A, NuMA n'est plus localisée au cortex cellulaire, tandis que sa concentration augmente au niveau des pôles du fuseau mitotique, sans pour autant affecter la localisation corticale de LGN (Gallini *et al.* 2016). En effet Aurora A, comme Warts, sont situées aux pôles du fuseau mitotique. Cette localisation suggère qu'elles permettent de libérer MUD/NuMA phosphorylée des pôles, pour favoriser la liaison avec PINS/LGN et sa localisation corticale (di Pietro *et al.* 2016).

La quantité de NuMA au cortex cellulaire augmente en **anaphase**, ce qui permet son interaction directe avec la membrane plasmique (Kotak *et al.* 2013, Kotak *et al.* 2014, Zheng *et al.* 2014). Cette augmentation est importante pour l'élongation du fuseau mitotique et la séparation des chromosomes (Kotak *et al.* 2013). La localisation corticale de NuMA dépend de sa phosphorylation par la kinase CDK1, la phosphatase PP2CA, et les protéines corticales 4.1 et PIP/PIP2, mais est indépendante de LGN et Gai (Kiyomitsu et Cheeseman 2013, Kotak *et al.* 2013, Kotak *et al.* 2014). L'orientation de la division cellulaire peut être altérée si NuMA n'est pas phosphorylée (Kotak et Gonczy 2014).

L'expression de **LGN** varie en fonction du cycle cellulaire, avec une augmentation de la protéine pendant la **mitose** (Du et Macara 2004). En interphase, LGN est dans sa conformation fermée et n'est pas exprimée au cortex cellulaire, mais dans le cytoplasme périnucléaire (Du et Macara 2004). Dans les neuroblastes de *Drosophila*, PINS est corticale en interphase (Bowman *et al.* 2006). Dans les lignées cellulaires PC12 et COS7, LGN est nucléaire au début de la mitose, et s'exprime au niveau du plan de clivage de la cellule en fin de division (Blumer *et al.* 2002). En prométaphase, LGN est localisée tout autour du cortex cellulaire, pour ensuite être polarisée au niveau des pôles du fuseau mitotique en métaphase et en anaphase. Kiyomitsu et Cheeseman



ont montré que la proximité des chromosomes avec le cortex cellulaire, inhibe la localisation corticale de LGN et NuMA (Kiyomitsu et Cheeseman 2012).

La protéine AGS3 est exprimée dans le cytoplasme, quelle que soit la phase du cycle cellulaire, et elle n'est pas polarisée en mitose (Blumer *et al.* 2002).

Ces données d'expression montrent que dans les cellules de vertébrés, la formation du complexe protéique ternaire **Gai-LGN-NuMA est spécifique de la mitose.**

La liaison entre LGN et NuMA, et celle entre LGN et mINSC sont exclusives, NuMA et mINSC compétitionnent pour se lier à LGN (Culurgioni *et al.* 2011). La perte de fonction de LIN-5 chez *C. elegans*, engendre une absence de GPR1/2 au cortex cellulaire (Srinivasan *et al.* 2003), tandis que dans le neuroépithélium de poulet, la localisation corticale de LGN n'est pas affectée en l'absence de NuMA (Peyre *et al.* 2011). NuMA contribue au recrutement de LGN à la membrane plasmique, en facilitant l'interaction entre les domaines GoLoco de LGN et Gai (Du et Macara 2004).

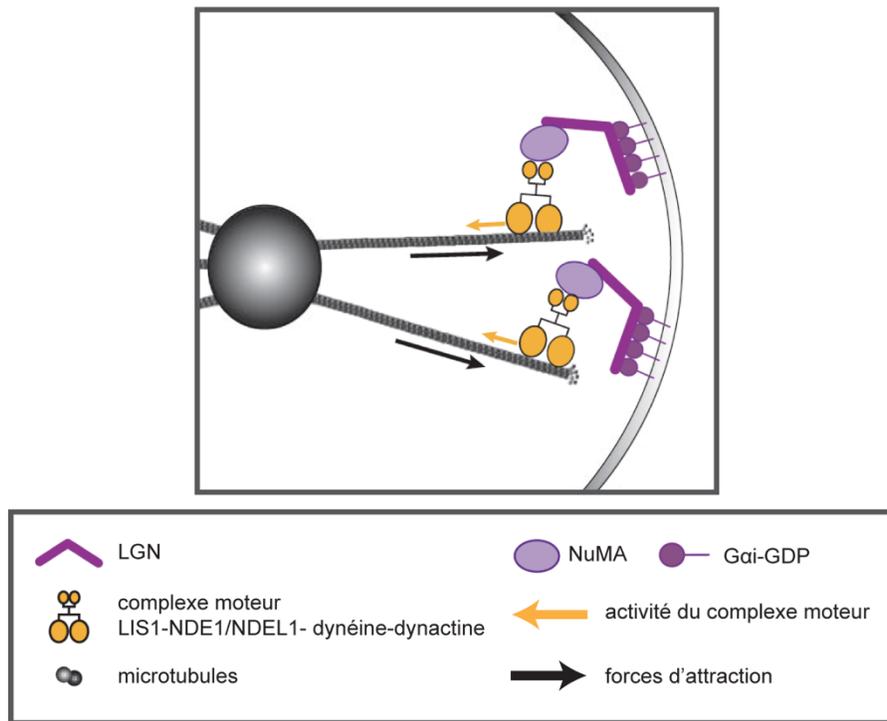
Dans les progéniteurs neuroépithéliaux de souris et de poulet, le complexe PAR est aussi situé au domaine apical ; Gai, localisée tout autour du cortex, s'associe avec LGN qui se lie à NuMA (Du *et al.* 2001) (**figure 8**). Or dans ces modèles de neuroépithéliums, LGN et NuMA sont restreints au cortex latéral (Morin *et al.* 2007, Konno *et al.* 2008, Peyre *et al.* 2011, Seldin *et al.* 2016) (**figure 8**). **La régulation qui contraint leur localisation latérale dans les progéniteurs corticaux reste inconnue.**

Quatrième étape : attraction des microtubules par NuMA pour orienter le fuseau mitotique

Après le recrutement de LIN-5/MUD/NuMA au cortex cellulaire, la protéine ancre le complexe moteur **LIS1** (*lissencephaly1*) - **NDE1/NDEL1** (*nudE neurodevelopment protein 1*) - **dynéine-dynactine** à la membrane plasmique, et des forces sont déployées du cortex cellulaire aux microtubules astraux, pour orienter le fuseau mitotique (Merdes *et al.* 1996, Haren et Merdes 2002, Couwenbergs *et al.* 2007, Nguyen-Ngoc *et al.* 2007, Siller et Doe 2008, Siller et Doe 2009, Kotak *et al.* 2012, Moon *et al.* 2014) (**figure 12**). Les microtubules participent à la



position du fuseau mitotique, en fonction de la forme de la cellule et des indices corticaux, tels que l'expression de NuMA polarisée sur la membrane cellulaire (They et Bornens 2006)



D'après Peyre et Morin, 2012

Figure 12. Attraction des microtubules par NuMA pour orienter le fuseau mitotique.

Gai_{GDP} est ancrée au cortex cellulaire, elle s'associe à LGN. LGN recrute NuMA, qui est liée au complexe moteur LIS1-NDE1/NDEL1-dynéine-dynactine présent sur les microtubules astraux. Cela génère des forces d'attraction sur les microtubules astraux, ce qui attire les centrosomes vers la membrane plasmique, et oriente le fuseau mitotique à l'horizontale, lorsque LGN-NuMA sont localisées au cortex latéral, ou à la verticale quand LGN-NuMA sont au cortex apical. Modifié de (Peyre et Morin 2012).

La **dynéine**, cytoplasmique ou corticale, est une protéine motrice qui exerce des forces d'attraction sur les microtubules en direction des terminaisons (-), situées aux centrosomes, action favorisée par son association avec la dynactine (Busson *et al.* 1998, Howell *et al.* 2001). La dynéine corticale s'associe aux microtubules astraux et attire les centrosomes vers la membrane plasmique (**figure 12**). La dynéine cytoplasmique attire les chromosomes vers les centrosomes, sur les microtubules kinétochoriens. Le gène *Lis1*, d'abord identifié comme responsable de la lisencéphalie, maladie sévère causée par des défauts de migration neuronale (Reiner *et al.* 1993); (Dobyns *et al.* 1993), est impliqué dans la régulation de l'orientation du



fuseau mitotique (Moon *et al.* 2014). *Lis1* favorise la liaison de la dynéine corticale aux terminaisons des microtubules, en augmentant l'intensité des mouvements des terminaisons des microtubules astraux en direction du cortex (Coquelle *et al.* 2002, Moon *et al.* 2014). NudE et ses homologues chez les mammifères **NDE1** et **NDEL1**, se lient à la fois à LIS1 et à la dynéine. Ils facilitent le recrutement de LIS1 par la dynéine (Sasaki *et al.* 2000, Li *et al.* 2005, Stehman *et al.* 2007, McKenney *et al.* 2011). Sans l'activateur de la dynéine, LIS1, l'orientation planaire du fuseau mitotique des progéniteurs murins neuroépithéliaux est altérée, ainsi que l'orientation apico-basale des neuroblastes (Pawlisz *et al.* 2008, Siller et Doe 2008, Yingling *et al.* 2008).

LIN-5/MUD/NuMA, située au cortex cellulaire et aux terminaisons "plus" des microtubules, est nécessaire pour le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique (Seldin *et al.* 2016). Sa perte de fonction chez la *Drosophila* engendre la perte de la localisation apicale du complexe LIS1-dynéine-dynactine, ce qui randomise l'orientation du fuseau mitotique, et provoque une légère augmentation du nombre de neuroblastes (Bowman *et al.* 2006, Izumi *et al.* 2006, Siller *et al.* 2006). L'asymétrie de la division cellulaire est détruite, cela peut provoquer une prolifération excessive des cellules souches neurales au détriment des neurones postmitotiques, voire des tumeurs et la mort de la *Drosophila* (Schaefer *et al.* 2000, Yu *et al.* 2000, Schaefer *et al.* 2001, Lee *et al.* 2006, Lee *et al.* 2006, Gonzalez 2007, Nipper *et al.* 2007, Cabernard et Doe 2009).

Dans l'embryon de *C. elegans*, la liaison entre GPR-1/2 et LIN-5 enrichit le cortex cellulaire en dynéine-dynactine. Un bref contact entre les terminaisons "plus" des microtubules astraux et le complexe dynéine-dynactine ancré au cortex, déclenche des forces de traction des microtubules astraux vers le cortex de la cellule. Sachant que le complexe LIS1-dynéine-dynactine est exprimé tout autour du cortex cellulaire et sur les microtubules de façon uniforme pendant tout le cycle cellulaire, **la fine régulation de la localisation mitotique de GPR-1/2 et LIN-5 est cruciale pour polariser le complexe cortical dynéine-dynactine et orienter le fuseau mitotique.** La diminution de α ou l'absence du complexe dynéine-dynactine conduisent à des défauts de position du fuseau mitotique et à une diminution des forces de



traction au niveau des cortex cellulaires antérieurs et postérieurs (Colombo *et al.* 2003, Couwenbergs *et al.* 2007, Nguyen-Ngoc *et al.* 2007).

Dans le cerveau en développement de souris, comme dans le tube neural de poulet, l'inactivation de LGN randomise l'orientation du fuseau mitotique pendant la phase proliférative précoce (Morin *et al.* 2007, Konno *et al.* 2008). Dans l'épiderme de souris, la perte de fonction de LGN, NuMA ou de la dynactine, engendre des divisions cellulaires planaires qui causent des défauts de stratification de l'épithélium, qui peuvent être létaux (Williams *et al.* 2011).

En résumé (figure 13), il a été démontré que le lien entre le complexe de polarité PAR et INSC/mINSC déclenche la cascade INSC-PINS-Gai-MUD ou mINSC-LGN-Gai-NuMA, qui engendre la localisation cortico-apicale du complexe dynéine-dynactine pour réguler l'orientation apico-basale du fuseau mitotique dans les neuroblastes de *Drosophila* et les progéniteurs de l'épiderme de souris. L'expression cortico-latérale de LGN-NuMA confère une orientation planaire aux divisions des progéniteurs neuraux de souris et de poulet, mais sa régulation reste inconnue.



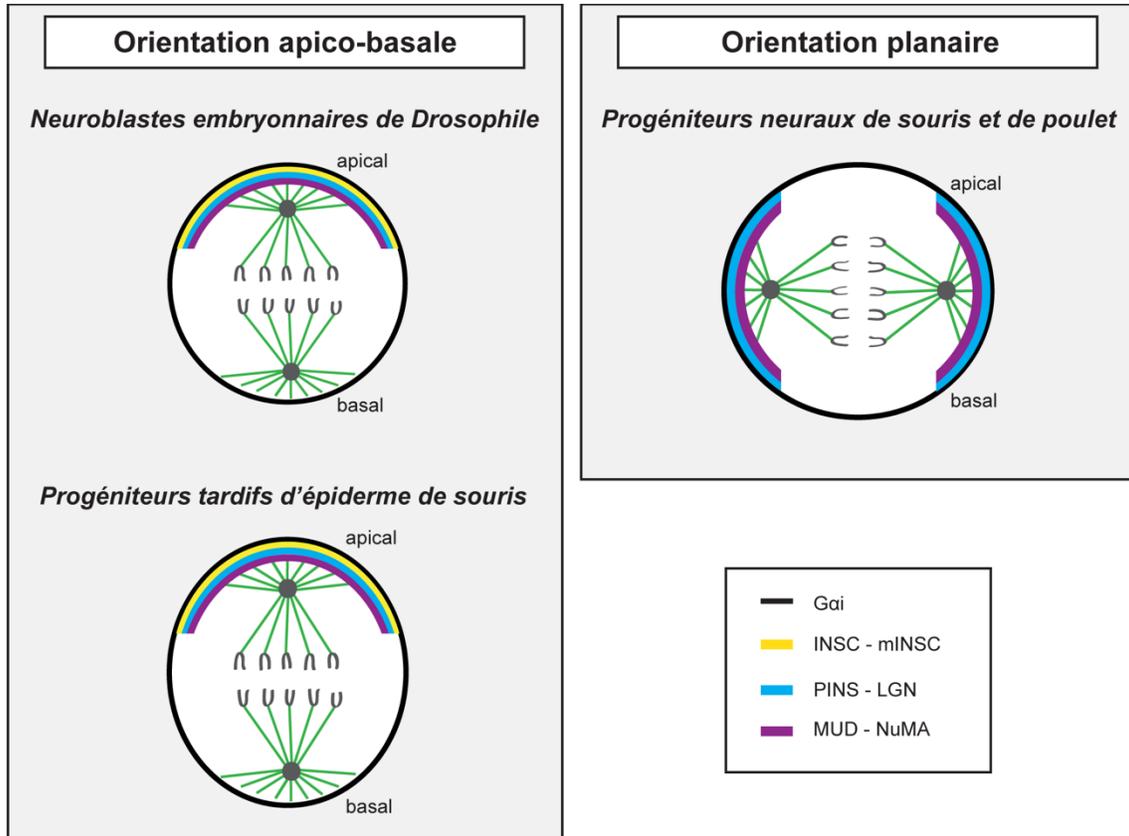


Figure 13. Régulation de l'orientation apico-basale et planaire.

L'orientation apico-basale du fuseau mitotique des neuroblastes embryonnaires de *Drosophile* et des progéniteurs tardifs d'épiderme de souris, est conférée par la localisation cortico-apicale du complexe INSC-PINS-Gai-MUD ou mINSC-LGN-Gai-NuMA, qui engendre le recrutement cortico-apical du complexe moteur de la dynéine. L'orientation planaire du fuseau mitotique des progéniteurs neuraux de souris et de poulet est conférée par l'expression cortico-latérale de LGN-NuMA et du complexe moteur de la dynéine. Dérivé de la (figure 8).

Autres voies

La localisation de LGN peut être régulée par d'autres voies de signalisation. Le suppresseur de tumeur **DLG** chez la *Drosophile*, **DLG1** chez les mammifères, est connu pour son rôle dans la polarité cellulaire. Avec deux autres suppresseurs de tumeur, LGL et SCRIB, ils forment les jonctions serrées des tissus épithéliaux de la *Drosophile*, maintiennent leur intégrité et leur polarité (Bergstralh *et al.* 2013). DLG, de la famille des protéines MAGUK, composées des domaines PDZ, SH3 et GUK, est associée à la membrane plasmique.



Chez la *Drosophile*, DLG joue également un rôle dans l'orientation du fuseau mitotique des divisions planaires des cellules épithéliales du futur thorax (*pupal notum*), des disques imaginaux et de l'épithélium folliculaire (Bellaïche *et al.* 2001, Bergstralh *et al.* 2013, Nakajima *et al.* 2013). Dans les neuroblastes, DLG est au cortex cellulaire apical et oriente le fuseau mitotique dans l'axe apico-basal (Siller et Doe 2009). Son rôle est conservé chez les mammifères, DLG1 régule l'orientation des **divisions cellulaires planaires des progéniteurs neuraux** de poulet (Saadaoui *et al.* 2014).

En termes de mécanisme, DLG/DLG1 interagit avec PINS/LGN et agit indépendamment d'INSC pour localiser PINS/LGN au cortex cellulaire (**figure 14**), *via* les microtubules (Bellaïche *et al.* 2001, Siegrist et Doe 2005, Johnston *et al.* 2009, Zhu *et al.* 2011). Le moteur kinésine 73 (KHC-73), ou GAKIN chez les mammifères, localise DLG aux terminaisons "plus" des microtubules astraux (Siegrist et Doe 2005, Johnston *et al.* 2009, Johnston *et al.* 2012, Bergstralh *et al.* 2013, Lu et Prehoda 2013). DLG/DLG1 s'attache ensuite au cortex de la cellule et recrute PINS/LGN aux terminaisons "plus" des microtubules astraux. C'est l'activation du domaine **LINKER** de PINS/LGN, situé entre les motifs TPR et GoLoco (**figure 11**), par la kinase mitotique centrosomale Aurora A, qui permet la liaison au domaine GUK de DLG/DLG1 (Johnston *et al.* 2009, Johnston *et al.* 2012) (**figure 14**).

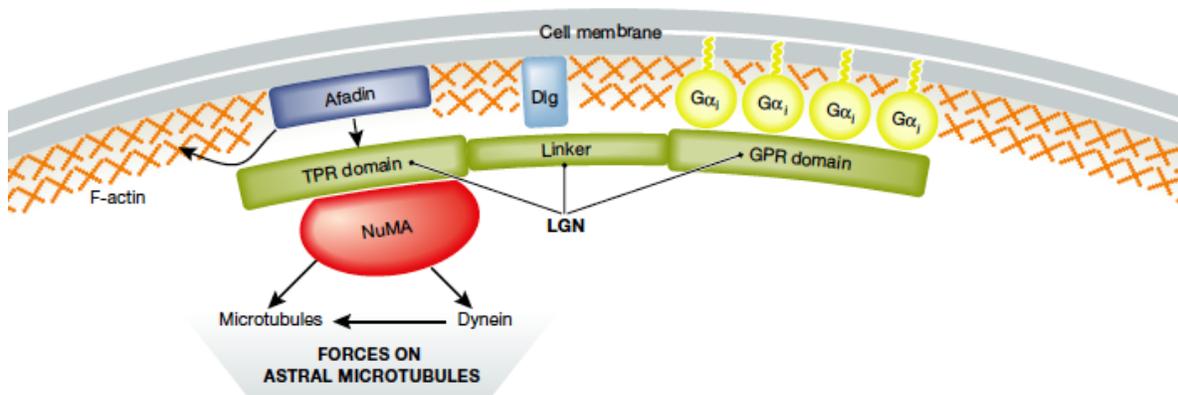


Figure 14. Mécanismes d'action de LGN avec Gai, NuMA, AFADIN et DLG.

Schéma illustrant les domaines de la protéine LGN et ses différentes interactions. LGN interagit avec la protéine membranaire Gai *via* ses domaines GoLoco (aussi appelés GPR), puis avec NuMA *via* ses domaines TPR. NuMA se lie avec le complexe moteur de la dynéine et actionne les forces déployées sur les microtubules astraux pour orienter le fuseau mitotique. La protéine DLG permet le recrutement



cortical de LGN, en se liant au domaine LINKER de LGN. La protéine AFADIN compétitionne avec NuMA pour se lier à LGN *via* ses domaines TPR pour recruter LGN au cortex cellulaire. D'après (di Pietro *et al.* 2016).

La perte de fonction de DLG/DLG1 ou de KHC-73 affecte l'orientation du fuseau mitotique, et sans DLG, PINS est localisée tout autour du cortex cellulaire (Siegrist et Doe 2005, Bergstralh *et al.* 2013).

Le **troisième mode d'action** découvert ces dernières années pour localiser LGN et influencer l'orientation du fuseau mitotique est *via* l'association avec la protéine **CANOE** chez la *Drosophile*, ou **AFADIN** chez les mammifères. Cette protéine est décrite pour son rôle dans la formation des jonctions adhérentes des cellules épithéliales (Takai et Nakanishi 2003). En l'absence de CANOE/AFADIN, l'orientation de la division des neuroblastes, des progéniteurs de muscles et des cellules épithéliales Caco-2 est perturbée, ainsi que la morphogénèse de l'épithélium (Speicher *et al.* 2008, Wee *et al.* 2011, Carminati *et al.* 2016).

En prophase, la protéine CANOE/AFADIN est localisée tout autour du cortex de la cellule, puis se restreint aux pôles du fuseau mitotique en métaphase et en anaphase, où elle va interagir avec PINS/LGN par ses domaines TPR (**figure 14**), localiser PINS/LGN au cortex, qui va ensuite recruter MUD/NuMA (Speicher *et al.* 2008, Wee *et al.* 2011, Carminati *et al.* 2016). CANOE/AFADIN est colocalisée aux pôles du fuseau mitotique avec LGN et NuMA (**figure 14**). Elle compétitionne avec NuMA pour se lier à LGN, mais l'affinité de LGN pour NuMA est plus grande. *In vitro*, l'absence d'AFADIN réduit le niveau de LGN au cortex cellulaire en métaphase et en anaphase, empêchant ainsi le recrutement de NuMA et de la dynéine. À l'inverse, l'absence de LGN ou de NuMA ne modifie pas la localisation d'AFADIN. De plus, CANOE/AFADIN se lie en même temps à la protéine membranaire corticale F-ACTINE, qui si perturbée, engendre la perte de LGN au cortex de la cellule (Kaushik *et al.* 2003, Carminati *et al.* 2016).

Enfin, dans le système nerveux périphérique des *Drosophiles*, la polarité des SOP dépend de la **PCP** (Roegiers et Jan 2004). La cellule mère pI, se polarise en réponse aux signaux PCP, conservés au travers de l'évolution. Le récepteur FZ recrute la protéine DSH au cortex



apical postérieur, où se situe le complexe de polarité BAZOOKA-PAR6-aPKC (Bellaïche *et al.* 2001, Roegiers *et al.* 2001) (**figure 8**). PINS est localisée au cortex antérieur opposé, et interagit avec Gai et DLG (**figure 8**). MUD est colocalisée avec PINS au cortex antérieur (Bellaïche *et al.* 2001, Izumi *et al.* 2006), mais peut également être colocalisée avec FZ-DSH au cortex postérieur (Segalen *et al.* 2010) (**figure 8**). Les complexes FZ-DSH et Gai-PINS-DLG contrôlent l'orientation du fuseau mitotique à travers NuMA (Morin et Bellaïche 2011). Au pôle postérieur, FZ-DSH contrôlent l'orientation antéro-postérieure du fuseau mitotique, tandis que Gai-PINS le maintiennent dans le plan de l'épithélium. Des mutations de FZ, DSH ou MUD engendrent des défauts d'orientation, et l'absence de PINS oriente le fuseau mitotique dans l'axe apico-basal (Gho et Schweisguth 1998, Lu *et al.* 1999, Segalen *et al.* 2010).

Les complexes BAZOOKA-PAR6-aPKC et Gai-PINS sont aux pôles opposés dans les SOP, alors qu'ils sont localisés au même pôle dans les neuroblastes de *Drosophile*, grâce au rôle intermédiaire de INSC (**figure 8**). De plus, NUMB et PON se localisent du côté antérieur des SOP, avec Gai-PINS-DLG, alors qu'ils sont aux pôles opposés dans les neuroblastes (Bellaïche *et al.* 2001) (**figure 8**). L'expression ectopique d'INSC dans les SOP, provoque une collaboration des complexes BAZOOKA-PAR6-aPKC et Gai-PINS-NuMA au cortex cellulaire antérieur et place NUMB au postérieur, de façon comparable aux neuroblastes (Bellaïche *et al.* 2001, Cai *et al.* 2003, Gonczy 2008).

V. 3. 3. Limites de la corrélation entre l'orientation et le destin cellulaire

L'étude de ces modèles montre le lien entre l'orientation du fuseau mitotique et la destinée différentielle des cellules filles résultantes d'une division asymétrique, comme un modèle conservé. Proposé pour la première fois chez les vertébrés, en 1995 par Chenn et McConnell, classiquement une division planaire est considérée comme symétrique, avec deux cellules filles identiques, de par l'égalité répartition des différents domaines et déterminants du destin cellulaire de la cellule mère. Tandis qu'une division verticale est décrite comme asymétrique, de par la différence d'héritage des déterminants cellulaires entre les deux cellules filles (Chenn et McConnell 1995, Zhong et Chia 2008). Conformément à cette idée, dans le cortex cérébral, comme dans la rétine, les divisions verticales sont surtout, voire seulement, observées pendant les phases neurogéniques, tandis que précocement les divisions horizontales



augmentent la population de progéniteurs (Cayouette *et al.* 2001, Haydar *et al.* 2003, Fish *et al.* 2006, Yingling *et al.* 2008).

Chez les mammifères, des équipes de scientifiques remarquent que la proportion de division asymétrique observée est pourtant bien supérieure à la proportion de division verticale. Depuis quelques années, des divisions planaires asymétriques sont observées dans le cortex cérébral en développement (Kosodo *et al.* 2004, Morin *et al.* 2007, Konno *et al.* 2008, Noctor *et al.* 2008, Hansen *et al.* 2010, Postiglione *et al.* 2011, LaMonica *et al.* 2013). En effet, une très faible inclinaison du fuseau mitotique, de l'ordre de quelques degrés, suffit à répartir asymétriquement le domaine apical de la cellule mère entre les deux cellules filles. Or, l'héritage de ce domaine apical ancre la cellule à la surface ventriculaire, ce qui, en plus de l'héritage du prolongement basal, lui permettrait de rester proliférative (Kosodo *et al.* 2004, Sanada et Tsai 2005, Konno *et al.* 2008).

Dans les temps précoces du développement cortical, les divisions horizontales permettent aux progéniteurs radio-gliaux (RG) de s'autorenouveler. Lors du pic de la neurogenèse, les RG se divisent à l'horizontale et à la verticale. La division horizontale est asymétrique, elle génère un RG plus un progéniteur intermédiaire (IP). Ils héritent tous deux du domaine apical, mais seul le RG hérite du prolongement basal. L'IP migre vers le pôle basal, se divise plusieurs fois symétriquement et produit des neurones. La division verticale est également asymétrique, elle forme deux progéniteurs différents, un RG héritant du domaine apical, plus un progéniteur externe (oRG) qui hérite seulement du prolongement basal. Cet oRG basal migre hors de la zone ventriculaire et se divise de nouveau à la verticale, pour former deux oRG différents, ou un oRG plus un IP qui produira des neurones (Fietz *et al.* 2010, Hansen *et al.* 2010, Postiglione *et al.* 2011, Shitamukai *et al.* 2011, Wang *et al.* 2011, LaMonica *et al.* 2013).

Comme évoqué plus haut, pour étudier les mécanismes de régulation de l'orientation du fuseau mitotique conduisant à une division cellulaire asymétrique, nous utilisons le modèle de la rétine de souris en développement.



LE DÉVELOPPEMENT DU SYSTÈME NERVEUX RÉTINIEN COMME MODÈLE D'ÉTUDE DE L'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE

I. Développement de l'œil chez les vertébrés

Tout le **système nerveux** se développe à partir de la plaque neurale, qui provient de l'épaississement de l'ectoderme, survenu au stade embryonnaire E8 chez la souris et à partir du vingtième jour de grossesse chez les humains. La plaque neurale s'invagine, se referme et devient le tube neural. Constitué d'un neuroépithélium et de plusieurs vésicules, dont le diencephale, qui s'évagine bilatéralement et génère les yeux (**figure 15**).

L'évagination bilatérale du diencephale constitue les vésicules optiques, qui s'étendent latéralement, et jusqu'à atteindre les placodes cristalliniennes (**figure 15A**), qui induisent la transformation des vésicules optiques en cupules optiques à E9.5, par épaississement du neuroectoderme (Spemann et Mangold 2001) (**figure 15B**). Les deux s'invaginent, deux feuilletts se créent. La couche interne de la cupule optique invaginée deviendra la rétine neurale et la couche externe, l'épithélium pigmentaire rétinien (**figure 15C**). Le cristallin dérive de la fermeture de la placode cristallinienne, à E13. À l'arrière de l'œil, le pédoncule optique deviendra le nerf optique, constitué de prolongements neuronaux qui rejoignent le cerveau aux alentours de E15.5 (**figure 15D**). La cornée et l'iris apparaissent en avant du cristallin (**figure 15E**) (Chow et Lang 2001, Graw 2010).

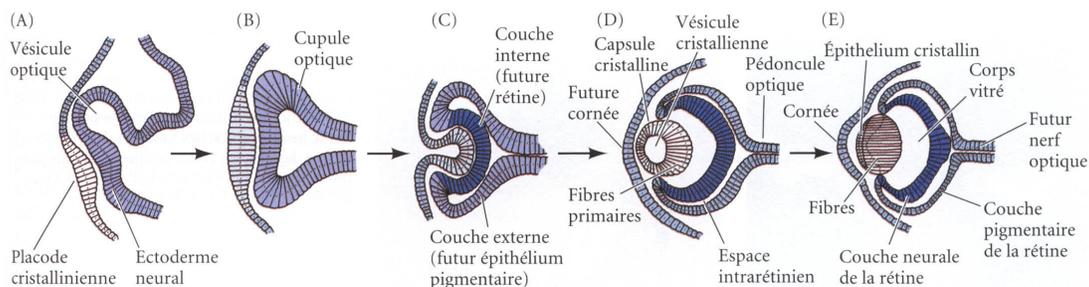


Figure 15. Le développement de l'œil.



(A) Vésicule optique (bleu) formée par évagination bilatérale du neuroectoderme du diencéphale jusqu'à la placode cristallinienne (gris clair). (B) E9.5. Cupule optique (bleu) formée par l'épaississement du neuroectoderme, induit par les placodes cristalliniennes (gris clair). (C) Invagination des cupules optiques. Formation d'un feuillet interne qui deviendra la rétine neurale (bleu foncé) et d'un feuillet externe qui deviendra l'épithélium pigmentaire rétinien. (D) E13. La placode cristallinienne se ferme et forme le cristallin. Le feuillet frontal formera la cornée. À l'arrière de l'œil, le pédoncule optique forme le futur nerf optique. (E) La cornée apparaît en avant du cristallin, le corps vitré en arrière, contraint par la rétine neurale. D'après le livre © Gilbert S. F. (2004). *Biologie du développement* (2^{ème} éd.). Lieu de publication : De Boeck.

II. La rétine adulte

II. 1. Organisation de la rétine adulte

La rétine mature est la couche neurosensorielle de l'œil, qui reçoit l'influx lumineux, le convertit en signal électrique et le transmet aux centres visuels du cerveau. Elle tapisse le fond de l'œil, entre le corps vitré et l'épithélium pigmenté rétinien, et mesure environ 200µm d'épaisseur chez l'humain adulte.

La classification et l'identification des neurones rétiniens a commencé il y a plus de 100 ans avec les observations du neuroscientifique espagnol **Santiago Ramón y Cajal (figure 2A)**, comme ici avec une de ses illustrations de la rétine de mammifère (**figure 16A**), datée de 1900, comparée à une section de rétine traitée par immunohistochimie avec des marqueurs protéiques spécifiques de chaque type cellulaire rétinien (**figure 16B**). Dans les deux représentations, **trois couches** de noyaux cellulaires se distinguent ainsi que la diversité des cellules rétiniennes. Ces couches nucléaires sont séparées par des couches de synapses, appelées les couches plexiformes externes (OPL) et internes (IPL) (**figure 16**).



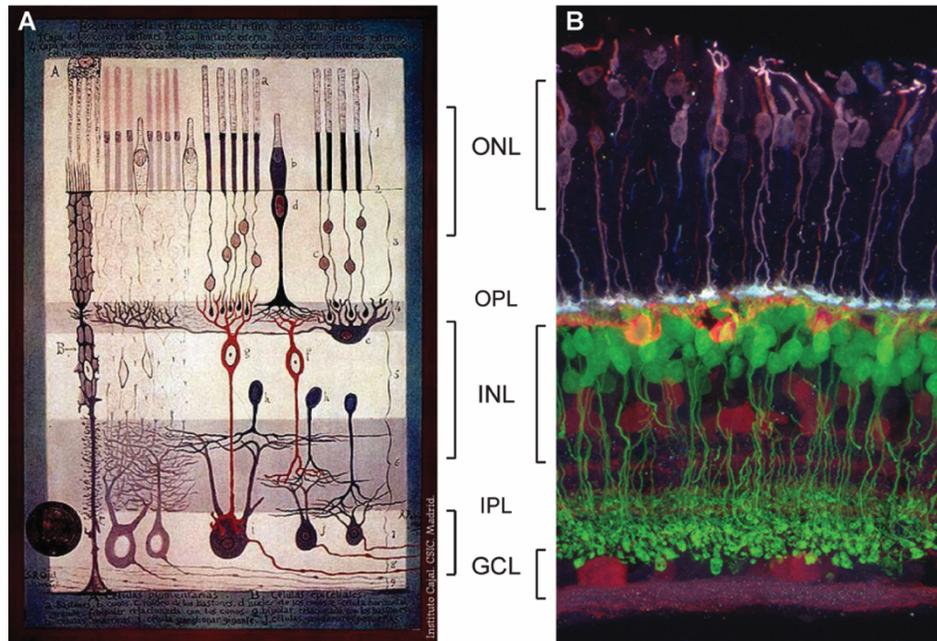


Figure 16. Représentations de la rétine au début et à la fin du XXe siècle.

(A) Illustration de la "structure de la rétine mammifère" par Ramón y Cajal, 1900. Distinction de plusieurs couches et de la diversité cellulaire rétinienne. Légendes sur la photo : (1) Couche des photorécepteurs (2) Membrane limitante externe (3) Couche granulaire externe (4) Couche plexiforme externe (5) Couche granulaire interne (6) Couche plexiforme interne (7) Couche des cellules ganglionnaires (8) Fibres du nerf optique (9) Membrane limitante interne (A) Cellules pigmentées (B) Cellules épithéliales (a) Bâtonnets (b) Cônes (c) Noyaux des bâtonnets (d) Noyaux des cônes (e) Cellules horizontales (f) Cellules bipolaires (associées aux cônes) (g) Cellules bipolaires (associées aux bâtonnets) (h) Cellules amacrines. (B) Photo d'une coupe transversale de rétine mature de souris. Cônes (violet) marqués par l'arrestin dans la couche nucléaire externe (ONL), séparés des autres couches par la couche synaptique plexiforme externe (OPL). Dans la couche nucléaire interne (INL) : les cellules horizontales (orange), cellules bipolaires (vert), cellules amacrines (rouge) marquées par la calbindine, sont séparés de la couche des cellules ganglionnaires (GCL) par la couche synaptique plexiforme interne (IPL). Les cellules ganglionnaires (rouge) sont marquées par la calbindine. © Josh Morgan, laboratoire de Rachel Wong.

II. 2. Les types cellulaires rétiniens

Du côté apical, la couche nucléaire externe (ONL), qui jouxte l'épithélium pigmenté rétinien, est composée des **photorécepteurs** de type bâtonnet et cône (**figure 17**). Sensibles à la lumière, ils assurent la phototransduction, soit la transformation de l'information visuelle en



influx nerveux pour le cerveau. Ils représentent 80% des cellules totales de la rétine adulte murine et font synapse avec les cellules horizontales et/ou bipolaires (**figure 17**).

Morphologiquement, ils sont composés d'un axone, un segment externe, relié à un segment interne par un cil (**figure 17**). Le segment externe est rectangulaire ou conique, d'où le nom respectif de photorécepteur bâtonnet ou cône (**figure 17**). Ce segment externe est constitué de milliers de disques, les uns sur les autres, contenant les pigments visuels sensibles à la lumière. Les disques des bâtonnets étant plus nombreux et entourés d'une membrane plasmique, ils sont plus sensibles à la lumière que les cônes. Les bâtonnets sont responsables de la vision nocturne ou scotopique, de la détection du noir et blanc, et de la vision périphérique qui permet la perception des mouvements. Tandis que les cônes sont impliqués dans la vision diurne ou photopique, centrale et des détails. Eux seuls détectent les couleurs.

À l'échelle moléculaire, les bâtonnets et les cônes se discriminent par leur pigment visuel, rhodopsine ou opsine respectivement. L'opsine est sensible à différentes longueurs d'onde. La majorité des mammifères sont dichromates. Ils possèdent deux types de cônes en fonction de la longueur d'onde détectée, qui contiennent l'opsine bleue ou rouge. Chez les primates, l'opsine verte s'est développée. De nombreux reptiles, oiseaux et poissons contiennent quatre ou cinq types de cônes.

Les **interneurones** sont les cellules horizontales, bipolaires et amacrines. Ils sont localisés dans la couche nucléaire interne (INL), qui contient également les noyaux des cellules gliales de Müller (**figure 17**). Les cellules **horizontales** ont une arborisation dendritique foisonnante dirigée vers les photorécepteurs (**figure 17**). Elles modulent les signaux reçus par un mécanisme d'inhibition latérale. Les cellules **bipolaires** sont les interneurones majoritaires de l'INL, elles sont une douzaine de sous-types et permettent la transmission verticale du signal entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires (**figure 17**). Les cellules de **Müller** constituent le type majeur des cellules gliales de la rétine, à côté des astrocytes et des microglies (Chen *et al.* 2002, Vecino *et al.* 2016). Elles sont essentielles au maintien de la fonction et de la survie des neurones, elles sont le support trophique et physique de la rétine. En cas de dommage, elles sont capables de réintégrer dans le cycle cellulaire pour se différencier, ou se transdifférencier pour s'autorenouveler ou former des neurones (Fischer et Reh 2001, Ooto *et*



al. 2004, Raymond *et al.* 2006, Bernardos *et al.* 2007). Chez les mammifères, le potentiel neurogénique fait consensus, mais pas la régénération (Hamon *et al.* 2016). Les cellules **amacrines** (**figure 17**) permettent de moduler l'information transmise des cellules bipolaires aux cellules ganglionnaires, et ont une trentaine de sous-types (MacNeil et Masland 1998).

La couche (GCL) des cellules **ganglionnaires** (RGC), homonyme du type cellulaire majoritaire qu'elle contient, est également composée de cellules amacrines dites déplacées (**figure 17**). Il existe une trentaine de sous-types de cellules ganglionnaires (Baden *et al.* 2016). Les axones basaux constituent les fibres du nerf optique connectées au cerveau, et l'autre pôle fait synapse avec les cellules bipolaires ou amacrines.

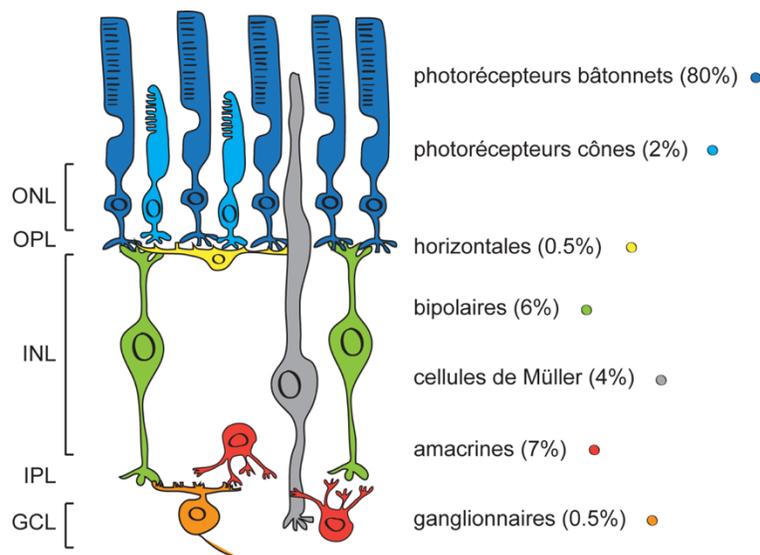


Figure 17. Structure de la rétine adulte des vertébrés.

Schéma des sept types cellulaires majeurs composant une rétine mature de vertébré et leur proportion en pourcentage dans une rétine adulte. Les photorécepteurs en bâtonnets (bleu foncé) constituent environ 80% des cellules totales de la rétine adulte murine, les photorécepteurs en cônes (bleu clair), environ 2%, les cellules horizontales (jaune) 0.5%, les cellules bipolaires (vert) 6%, les cellules gliales de Müller (gris) 4%, les cellules amacrines (rouge) 7%, et les cellules ganglionnaires (orange) 0.5%. Modifié de (Martins et Pearson 2008).

Comment cette diversité neuronale est-elle produite au cours du développement ? Quels sont les mécanismes moléculaires et cellulaires régulateurs ?



III. Développement de la rétine : prolifération, différenciation et spécification

Au début de la rétino-genèse, la rétine est une couche neuroépithéliale de cellules progénitrices en division, qui prolifèrent pour accroître la population de progéniteurs, avant de sortir progressivement du cycle cellulaire pour se différencier en précurseur puis en neurones postmitotiques. Un précurseur est dit commis, engagé, dans une voie de différenciation. C'est une cellule non proliférative, postmitotique, qui exprime une partie des gènes caractéristiques du type cellulaire mature dans lequel elle va se différencier.

III. 1. Migration nucléaire intercinétique

Comme dans la plupart des tissus neuroépithéliaux, les noyaux des progéniteurs rétiniens migrent sur toute la largeur de la rétine, entre deux mitoses et en fonction de la phase du cycle cellulaire (**figure 18**). Ces mouvements sont désignés par le terme de **migration intercinétique des noyaux** (INM) (Baye et Link 2007), décrits pour la première fois dans le tube neural (Sauer 1935). Chaque mitose a lieu à la membrane ventriculaire du cortex cérébral ou à la membrane apicale de la rétine, où sont localisés les centrosomes en interphase (**figure 18**). Puis le noyau descend en phase G1 jusqu'à la surface basale, où il a lieu la phase S ; remonte en phase G2, jusqu'à la surface apicale pour procéder à la mitose, puis les deux noyaux redescendent en G1, et ainsi de suite (**figure 18**).

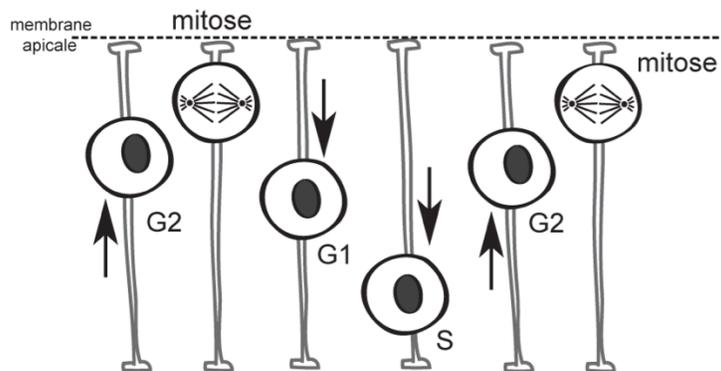


Figure 18. Migration intercinétique des noyaux.

Les noyaux des progéniteurs migrent de haut en bas sur la largeur du tissu rétinien. La phase G2 a lieu quand le noyau remonte de la surface basale vers la membrane apicale, où a lieu la mitose. Le noyau redescend en phase G1 jusqu'à la surface basale où a lieu la phase S. Et le cycle continue.



III. 2. Contrôle spatial de la rétino-genèse

Aussi bien chez l'humain que chez les rongeurs, la région centrale de la rétine commence à se différencier avant la région périphérique (Young 1985). La prolifération centrale est terminée aux environs des jours postnataux P5-6, et à P11 dans la rétine périphérique chez la souris (Young 1985). Chez le poisson-zèbre, la différenciation progresse du centre vers la périphérie, et du côté nasal vers le temporal (Hu et Easter 1999, He *et al.* 2012).

III. 3. Production chronologique de la diversité cellulaire

Phénomène remarquable, comme dans de nombreuses autres aires corticales (McConnell 1989), les cellules rétiniennees sont formées dans un **ordre chronologique** précis et conservé au travers de l'évolution (Livesey et Cepko 2001, Rapaport *et al.* 2004) (**figure 19**). Seule la durée de la rétino-genèse diffère entre les espèces (Cepko *et al.* 1996). La date de naissance des neurones et des cellules gliales a été déterminée par un marquage à la thymidine H³ (Sidman 1961). Les cellules rétiniennees naissent par plusieurs vagues de différenciations qui se chevauchent dans le temps (Young 1985, Rapaport *et al.* 1996) (**figure 19**). Chez la souris, la rétino-genèse commence à E11 et se termine après la naissance à P7-P10 environ, les paupières s'ouvrent vers P14 (Young 1985, Young 1985). Les différents types cellulaires sont généralement classés en deux groupes, avec les neurones précoces embryonnaires et les neurones plus tardifs et postnataux (**figure 19**). Les cellules ganglionnaires et horizontales sont les premières à être générées, avec un pic de production autour de E13.5 chez la souris. Lors de la deuxième vague de différenciation, entre E12 et E18, les photorécepteurs en cônes et les amacrines apparaissent (**figure 19**). Les photorécepteurs en bâtonnets, les cellules bipolaires et gliales de Müller sont les derniers types cellulaires à être formés (**figure 19**). Chez l'humain, les photorécepteurs sont formés aux environs de la dixième semaine de grossesse, la rétino-genèse se termine lors de la dix-neuvième semaine (temps répertoriés dans (Martins et Pearson 2008)).



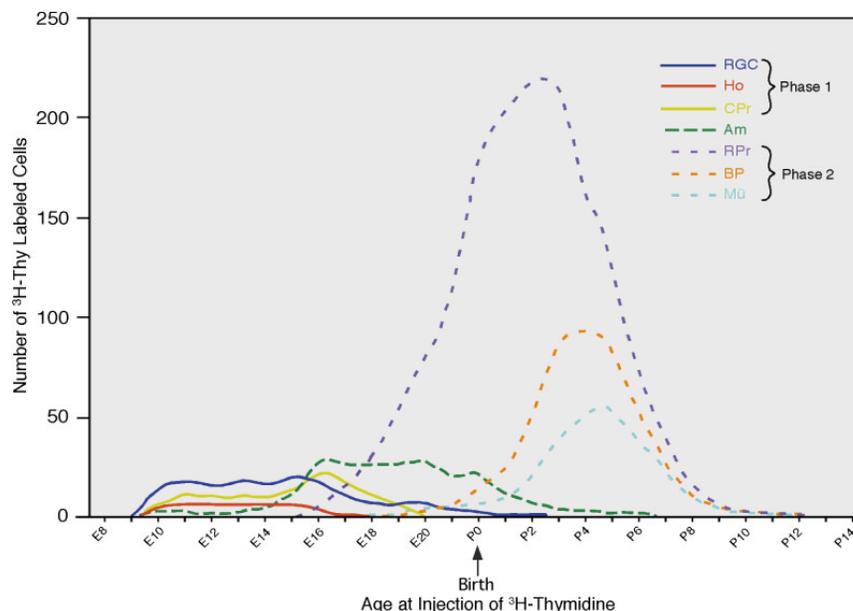


Figure 19. Différenciation chronologique des cellules rétinienne de rat et leur proportion.

Les cellules rétinienne apparaissent dans un ordre chronologique précis au cours du développement, par vagues de différenciation qui se chevauchent dans le temps. Chaque courbe représente un type cellulaire, les lignes pleines représentent les neurones dits précoces, avec les cellules ganglionnaires (RGC), les cellules horizontales (Ho), les photorécepteurs en cônes (CPr). Les amacrine (Am) sont produites sur une longue période, à partir des stades embryonnaires très précoces jusqu'aux stades postnataux. Les neurones produits plus tard, lors de la phase 2, sont représentés par des lignes pointillées, avec les photorécepteurs en bâtonnets (RPr), les bipolaires (BP) et les cellules de Müller (Mu). Leur date de naissance, déterminée par un marquage à la thymidine H^3 est indiquée sur l'axe des abscisses. La proportion de chaque type cellulaire par rapport au nombre total de cellules marquées à la thymidine H^3 est représentée par l'aire sous la courbe. D'après (Rapaport *et al.* 2004).

III. 4. Multipotence et compétence des progéniteurs rétiniens

Des expériences d'exploration du lignage cellulaire avec des rétrovirus et/ou des traceurs chez la souris, le *Xénope* et le poisson ont mis en évidence la multipotence des progéniteurs rétiniens. Les six types de neurones rétiniens et les cellules gliales de Müller proviennent tous d'un **progéniteur commun** (Price *et al.* 1987, Turner et Cepko 1987, Holt *et al.* 1988, Wetts et Fraser 1988, Turner *et al.* 1990, Cepko *et al.* 1996, Marquardt et Gruss 2002).

À un stade tardif de la rétino-genèse, Turner et Cepko injectent un rétrovirus *in vivo* dans des rétines postnatales de rat et analysent, quatre à six semaines plus tard, la descendance des cellules qui ont incorporé le virus (Turner et Cepko 1987). Grâce à l'utilisation d'un vecteur



rétroviral, seules les cellules en division sont infectées, et le gène d'intérêt et son rapporteur s'incorporent dans le génome et sont transmis à la descendance. Descendance qui s'organise en **clone** radial, c'est-à-dire que ce sont des cellules juxtaposées en colonne dans la largeur de la rétine. Lorsque les clones sont composés de seulement deux neurones postmitotiques, c'est qu'il s'agissait de la dernière mitose, soit une division cellulaire terminale.

Les progéniteurs sont multipotents, mais ne peuvent pas former tous les types cellulaires, à tous les stades. Aux stades embryonnaires, ils forment les types cellulaires rétiniens précoces, et plus tard, ils perdent cette compétence et acquièrent un potentiel de différenciation restreint aux types cellulaires tardifs. Ils changent leur état de compétence au cours du temps, c'est le **modèle de compétence** (Turner et Cepko 1987, Turner *et al.* 1990, Cepko *et al.* 1996, Livesey et Cepko 2001, Cayouette *et al.* 2003).

Isolés de leur environnement, ou co-cultivés avec des cellules d'un stade différent, les progéniteurs engendrent des clones dans le même ordre, même taille et même composition qu'escompté *in vivo* (Reh et Kljavin 1989, Watanabe et Raff 1990, Belliveau et Cepko 1999, Belliveau *et al.* 2000, Cayouette *et al.* 2003). Ils conservent leur capacité à générer les types cellulaires requis en fonction du stade de développement. Ces études démontrent que les progéniteurs ont une "**horloge interne**" pour réguler leur prolifération et leur destin cellulaire de manière autonome, indépendamment de l'environnement cellulaire (Cayouette *et al.* 2006).

III. 5. Facteurs intrinsèques

III. 5. 1. Identité temporelle des progéniteurs rétiniens

Le modèle de compétence observé dans la rétine des vertébrés est corrélé avec le développement du **système nerveux central de la *Drosophila***, où les neuroblastes sont aussi multipotents, et passent au travers de divisions successives, pour former les différents types cellulaires à des temps précis.

Les progéniteurs des neuroblastes progressent temporellement dans le lignage, grâce à une cascade de quatre facteurs de transcription, toujours exprimés dans le même ordre, selon le stade de développement, qui leurs confèrent une identité temporelle spécifique (Doe et Technau 1993, Pearson et Doe 2004, Bayraktar et Doe 2013). Ces facteurs régulent les changements de



compétence des progéniteurs à s'engager dans une voie de différenciation en particulier. Le destin cellulaire de la cellule fille dépend de l'état de compétence de la cellule mère au moment de la sortie du cycle cellulaire, elle hérite du facteur de transcription qu'exprimait le neuroblaste mère en division (Isshiki *et al.* 2001, Pearson et Doe 2003).

Ces facteurs sont *Hunchback*, *Krüppel*, *Pdm* et *Castor* (Isshiki *et al.* 2001, Brody et Odenwald 2005, Cleary et Doe 2006, Grosskortenhaus *et al.* 2006). Ils sont conservés chez les vertébrés (Mattar *et al.* 2015). Leurs quatre homologues ont été identifiés dans la rétine des mammifères en développement et leur rôle dans la régulation de la compétence intrinsèque des progéniteurs rétiniens est conservé (Blackshaw *et al.* 2004, Elliott *et al.* 2008, Trimarchi *et al.* 2008, Mattar *et al.* 2015). Dans la rétine, le facteur de transcription ***Ikaros*** (*Ikzf1*), homologue de *Hunchback* chez les vertébrés, est nécessaire et suffisant pour induire les neurones rétiniens précoces chez la souris (Georgopoulos *et al.* 1992, Isshiki *et al.* 2001, Pearson et Doe 2004, Elliott *et al.* 2008). À l'inverse, l'homologue de *Castor*, ***Castor*** (*Cas1*), qui agit en aval d'*Ikaros*, est nécessaire pour générer des neurones moyens et tardifs (Mattar *et al.* 2015). Il est à noter que *Castor* n'agit pas dans les derniers stades de la rétino-genèse, suggérant qu'il existe un ou plusieurs autres gènes membres de la cascade qui interviendraient en aval de *Castor* (Mattar *et al.* 2015).

Ces facteurs sont indispensables à la progression temporelle des progéniteurs au travers de leurs états de compétences, mais ne sont pas suffisants. Les progéniteurs sont certes hétérogènes au cours du temps, mais lorsqu'ils sont observés au même stade, leur expression génique peut aussi différer en fonction de leur futur destin cellulaire (Jasoni et Reh 1996, Alexiades et Cepko 1997, Dyer et Cepko 2001, Trimarchi *et al.* 2008).

III. 5. 2. Facteurs de détermination cellulaire

La prolifération, le destin cellulaire, ainsi que l'état de compétence des progéniteurs sont influencés par des facteurs de transcription des familles **bHLH** (*basic helix-loop-helix*), à **homéodomaine**, ou les *forkhead* (Cepko 1999, Vetter et Brown 2001, Marquardt 2003, Zuber *et al.* 2003, Hatakeyama et Kageyama 2004, Zaghloul *et al.* 2005, Ohsawa et Kageyama 2008).



Il existe deux groupes de facteurs bHLH, les activateurs, comme *Math5/Atoh7* (*mammalian atonal homolog 5/atonal BHLH transcription factor 7*) et *Mash1/Ascl1* (*mammalian achaete scute homolog 1/achaete-scute family bHLH transcription factor 1*) et les inhibiteurs, comme *Hes1* et *Hes5* (*mammalian hairy and enhancer of split homolog 1 et 5*). Les inhibiteurs empêchent la différenciation neuronale, en maintenant les progéniteurs dans leur état prolifératif, et aux stades postnataux, ils favorisent la différenciation des cellules gliales (Hatakeyama et Kageyama 2004). À l'inverse, les gènes bHLH activateurs sont des gènes proneuraux et inhibiteurs de la gliogenèse (Bertrand *et al.* 2002). Ils ne sont cependant, pas suffisants pour induire la spécification en un type neuronal particulier. C'est pourquoi ils coopèrent avec les facteurs de transcription à homéodomaine, qui eux vont réguler le choix de la couche cellulaire où se différencier, et dans ce choix déjà restreint, les bHLH activateurs vont induire une spécification neuronale (Hatakeyama *et al.* 2001, Hatakeyama et Kageyama 2004).

Depuis l'observation du rôle majeur du facteur de transcription *Pax6* (*paired box protein 6*) dans la formation de l'œil de *Drosophile* et de celui des mammifères (Halder *et al.* 1995), un réseau de gènes communs à plusieurs espèces a été identifié (Graw 2010) (**figure 20**). Les premiers facteurs de transcription responsables du développement de l'œil sont exprimés dans la région du champ visuel présomptif, au centre de la plaque neurale antérieure (Adelmann). Ce sont les facteurs de transcription **EFTF** (*eye field transcription factor*) : *Pax6*, *Rx/Rax* (*retina and anterior neural fold homeobox*), *Six3* (*Sine oculis homeobox 3*), *Six6* (*Sine oculis homeobox 6*), *Nr2e1* (*nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1*), *ET/Tbx3* (*EyeT-box/T-box 3*), *Math5/Atoh7* et *Lhx2* (*LIM homeobox 2*), identifiés chez le *Xénope* (Zuber *et al.* 2003) (**figure 20**). Ils assurent la multipotence des progéniteurs, le début de leur spécification et certains restent exprimés chez l'adulte.

Pax6 est exprimé dans le tube neural et conservé pour la formation des vésicules optiques et du cristallin (Baumer *et al.* 2002). Il est exprimé chez l'adulte, dans les cellules amacrines et ganglionnaires (Ashery-Padan et Gruss 2001) (**figure 20**). Indispensable au maintien de la multipotence des progéniteurs rétiniens, le mutant hétérozygote a une microphthalmie, le mutant homozygote meurt quelques jours après la naissance et présente une anophtalmie chez la souris et la *Drosophile* (Hill *et al.* 1991, Quiring *et al.* 1994, Ashery-Padan



et Gruss 2001, Marquardt *et al.* 2001). Sa surexpression conduit à une formation ectopique d'œil chez la *Drosophila* et chez le *Xénope* (Halder *et al.* 1995, Chow *et al.* 1999).

Chaque type cellulaire rétinien adulte peut être caractérisé par l'immunomarquage de facteurs de transcriptions (**figure 16B et figure 20**) requis pour leur production, que nous retrouverons dans les chapitres de résultats, et d'autres facteurs sont exprimés seulement transitoirement pendant leur développement.

Les **bipolaires** sont identifiables par l'expression des facteurs de transcription à homéodomaine *Chx10* (*ceh-10 homeo domain containing homolog*) et *Isl1* (*Islet 1, insulin gene enhancer protein*), qui contrôle aussi la différenciation d'un sous-type d'amacrine et de ganglionnaires chez la souris (Liu *et al.* 1994, Elshatory *et al.* 2007, Elshatory *et al.* 2007, Bejarano-Escobar *et al.* 2015) (**figure 20**). *Chx10* est précocement spécifique de la rétine neurale. *Mash1/Ascl1* et *Math3/NeuroD4* (*neuronal differentiation 4*) sont des facteurs bHLH activateurs nécessaires à la spécification des bipolaires.

Les **photorécepteurs** sont identifiables par l'expression des facteurs de transcription *Otx2* (*orthodenticle homeobox 2*) et *Blimp1/Prdm1* (*B-lymphocyte-induced maturation protein 1/PR domain zinc finger containing 1*) (**figure 20**). Pour distinguer les cônes, des bâtonnets, les premiers expriment l'opsine et les bâtonnets, la rhodopsine, la recoverine et les facteurs *Crx* (*cone rod homeobox*) et *Nrl* (*neural retina leucine zipper*) (Mears *et al.* 2001, Swaroop *et al.* 2010) (**figure 20**). *Otx2* et *Chx10* induisent la transcription du gène *Crx*, qui active le facteur *Nrl*, spécifique des bâtonnets, et inhibiteur de la spécification en cônes (Chen *et al.* 1997, Mears *et al.* 2001, Oh *et al.* 2007). *Nrl* est apparu au cours de l'évolution avec les bâtonnets, après les cônes, quand il a fallu développer des habiletés pour voir en faible lumière (Okano *et al.* 1992, Jacobs *et al.* 1993, Larhammar *et al.* 2009, Warrant 2015), lorsque les mammifères précoces ont eu besoin de voir dans le noir pour éviter les prédateurs par exemple (Kim *et al.* 2016). *Mash1/Ascl1* est aussi exprimé dans les photorécepteurs en développement (Ahmad 1995).



L'expression de la protéine LIM1/LHX1 (*LIM homeobox 1*) permet de caractériser les cellules **horizontales** chez la souris (Poche *et al.* 2007, Keeley *et al.* 2013) (**figure 20**). *Pax6*, *Six3*, *Math3/NeuroD4*, *Prox1* (*prospero homeobox 1*), *Ptf1a* (*pancreas transcription factor 1a*), *Foxn4* (*forkhead box N4*), *Oct1* et *Oct2* (*onecut 1 et 2*) sont aussi exprimés dans les cellules horizontales, ils sont nécessaires à leur différenciation et localisation (Dyer *et al.* 2003, Li *et al.* 2004, Fujitani *et al.* 2006, Emerson *et al.* 2013, Wu *et al.* 2013, Klimova *et al.* 2015). *Foxn4* est aussi exprimé dans les amacrines et contrôle l'expression de *Prox1*, également exprimé dans les bipolaires, un sous-type d'amacrines et les Müller (Li *et al.* 2004, Cid *et al.* 2010).

Les protéines spécifiques des cellules de **Müllers** sont SOX9 (*sex-determining region Y-box containing gene 9*), GS (*glutamine synthetase*), cycline D3 (**figure 20**), CRALBP (*cellular retinaldehyde-binding protein*), et GLAST (*glutamate-aspartate transporter*) (Bunt-Milam et Saari 1983, Derouiche et Rauen 1995, Lehre *et al.* 1997, Dyer et Cepko 2000, Poche *et al.* 2008). *Math3/NeuroD4* et *Mash1/Ascl1* sont également impliqués dans leur différenciation (Hatakeyama *et al.* 2001).

La protéine SYNTAXIN-1 (HPC-1) est spécifique des cellules **amacrines** (Barnstable *et al.* 1985) (**figure 20**). Avec un co-marquage, les facteurs *Foxn4* et *Pax6* peuvent être utilisés, mais ils sont aussi exprimés dans les cellules horizontales et les cellules ganglionnaires, respectivement (Ashery-Padan et Gruss 2001, Li *et al.* 2004). *Six3* et *NeuroD* sont exprimés dans les cellules amacrines et *Math3/NeuroD4* de façon transitoire pendant leur développement (Morrow *et al.* 1999).

Les **cellules ganglionnaires** sont générées grâce au gène bHLH activateur proneural *Math5/Atoh7*, qui active l'expression du facteur de transcription *Brn3b/Pou4f2* (*brain specific homeobox 3b/POU class 4 homeobox 2*), nécessaire pour la différenciation terminale des RGC (Gan *et al.* 1996, Brown *et al.* 2001, Wang *et al.* 2001). Les gènes *Brn3a/Pou4f1* et *Brn3b/Pou4f2* sont conservés dans les RGC adultes avec *Pax6* (Xiang *et al.* 1995, Badea *et al.* 2009) (**figure 20**).



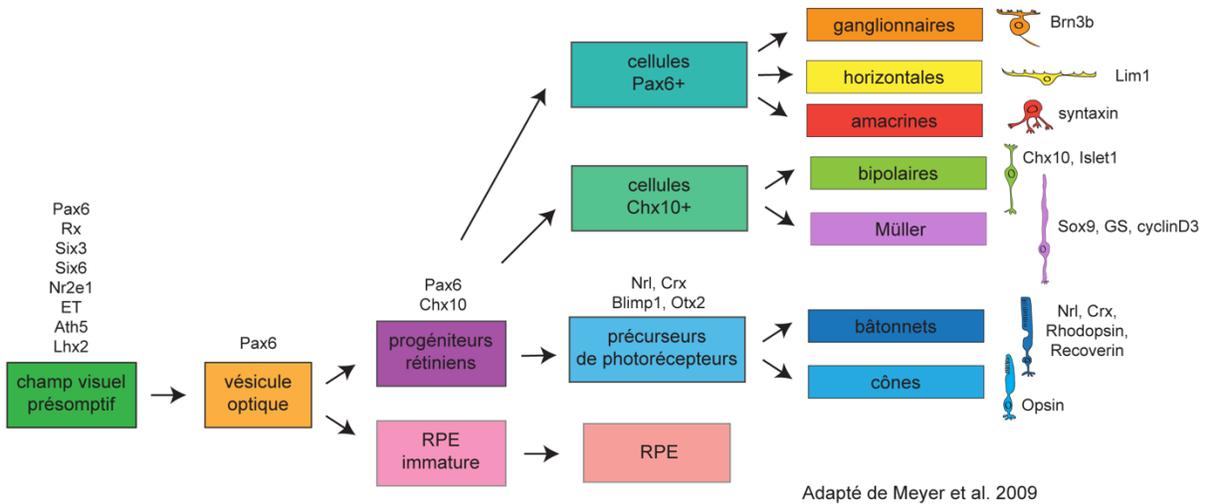


Figure 20. Rétinogenèse et spécificité génique des types cellulaires.

Schéma illustrant les différentes étapes de la rétinogenèse, indiquée par un rectangle de couleur, avec des marqueurs spécifiques correspondants. Les cellules du champ visuel présomptif expriment les marqueurs *EFTF* : *Pax6*, *Rx/Rax*, *Six3*, *Six6/Optx2*, *Nr2e1*, *ET/Tbx3*, *Ath5* et *Lhx2*. Le gène *Pax6* est exprimé dans les vésicules optiques et dans les progéniteurs rétiniens. Après l'invagination des vésicules optiques en cupules optiques, certaines cellules se spécifient en cellules épithéliales, qui formeront l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE), ou en cellules neuronales et gliales. Les cellules ganglionnaires, horizontales et amacrines se différencient de précurseurs exprimant *Pax6*, et les cellules bipolaires et Müller dérivent de précurseurs exprimant *Chx10*. Les précurseurs des photorécepteurs expriment plusieurs gènes, dont certains seront spécifiques des bâtonnets. Modifié de (Meyer *et al.* 2009).

III. 5. 3. Le cycle cellulaire et l'apoptose

Les régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose font partie des facteurs intrinsèques qui influencent la prolifération et le stade de différenciation rétinienne.

Au cours de la rétinogenèse, la prolifération et la sortie du **cycle cellulaire** des progéniteurs sont coordonnées (Dyer et Cepko 2001, Donovan et Dyer 2005). Les progéniteurs progressent dans les différentes phases du cycle cellulaire selon l'activité des protéines kinases *cyclin dependent kinase* (CDK), de leurs activateurs, les *CDK activating kinase* (CAK), et de leurs inhibiteurs, les *CDK inhibitor* (CKi) (Sanchez et Dynlacht 2005). Les CDK activées se combinent aux cyclines, comme cycline D1, qui permet la progression en phase G1 (Fantl *et al.* 1995, Sicinski *et al.* 1995). Les CKi bloquent la transition qui permet aux progéniteurs d'entrer



en phase S, et favorisent la sortie du cycle cellulaire et la différenciation, comme la CKI p27(KIP1), qui inhibe cycline D1 (Levine *et al.* 2000, Dyer et Cepko 2001, Geng *et al.* 2001).

L'apoptose est un processus de **mort cellulaire programmée**, qui régule la taille de la population de chaque type cellulaire, au cours du développement du système nerveux central, comme dans la rétine (Young 1984 , Oppenheim 1991 , Voyvodic *et al.* 1995). Au cours de la neurogenèse, environ la moitié des neurones produits vont mourir d'après un processus spatio-temporel conservé (Barde 1989). Dans la rétine, comme dans le système nerveux central, il existe deux périodes d'apoptose, l'une précoce au cours des stades prolifératifs, et la deuxième lors des deux premières semaines postnatales, au cours de la synaptogenèse (Young 1984 , Braunger *et al.* 2014). La quantité de cellules apoptotiques dans la rétine varie selon les espèces (Vecino *et al.* 2004). De nombreux signaux extracellulaires et intrinsèques peuvent déclencher la mort des progéniteurs ou neurones rétiniens, comme des neurotransmetteurs et des facteurs neurotrophiques (Vecino *et al.* 2004, Linden *et al.* 2005 , Braunger *et al.* 2014).

III. 6. Les facteurs extrinsèques

C'est le fruit de **combinaisons complexes** entre des facteurs intrinsèques et des signaux extrinsèques, qui va dicter l'expression différentielle des gènes impliqués dans le changement de compétence des progéniteurs, ou leur spécification (Cepko 1999).

Les **signaux environnementaux** régulent la prolifération des progéniteurs rétiniens, la sortie du cycle cellulaire, la durée de l'état de compétence, et/ou la différenciation et la spécification vers un destin cellulaire. Ils sont généralement sécrétés par des cellules différenciées déjà en place et par l'épithélium pigmentaire rétinien (Sheedlo et Turner 1996). Ces signaux peuvent agir comme inhibiteurs, par boucle de rétroaction sur les progéniteurs, pour les empêcher de former certains types cellulaires. Le mécanisme de rétroaction le plus étudié est celui des cellules ganglionnaires, qui sécrètent des signaux comme Shh et *growth differentiation factor 11* (GDF11), et régulent leur propre nombre final (Kim *et al.* 2005, Mu *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005). Le facteur de transcription *Brn3b/Pou4f2* empêche, par régulation



négative, les précurseurs des cellules ganglionnaires de former des amacrines, des horizontales et des types cellulaires tardifs (Qiu *et al.* 2008).

Le développement du champ visuel présomptif en œil résulte de l'expression d'antagonistes de la voie BMP, coordonnée avec les signaux du facteur de croissance *basic fibroblast growth factor* (bFGF), les voies de signalisation Shh et Wnt (Zuber *et al.* 2003, Fuhrmann 2008). La régionalisation proximo-distale des cupules optiques résulte d'un gradient d'expression des voies BMP, Shh, Wnt et Notch (Zhao *et al.* 2010).

La voie de signalisation **Shh** est impliquée dans la séparation du champ visuel des deux hémisphères (Chiang *et al.* 1996, Li *et al.* 1997). Sa perte de fonction conduit à une cyclopie et une holoproencéphalie (Litingtung et Chiang 2000). Plus tard au cours du développement, les signaux de **Shh** modulent la longueur du cycle cellulaire, qui augmente d'ailleurs avec la progression de la rétinogenèse (Alexiades et Cepko 1996, Wallace 2008, Agathocleous et Harris 2009). Ils stimulent la prolifération des progéniteurs rétiniens pour maintenir leur multipotence (Jensen et Wallace 1997, Wang *et al.* 2005), et régulent leur destin cellulaire (Levine *et al.* 1997, Perron *et al.* 2003, Yu *et al.* 2006, Wallace 2008).

La voie **Notch/Delta** interagit avec Shh pour maintenir la multipotence des progéniteurs, par inhibition latérale entre cellules adjacentes pour que chacune adopte un destin cellulaire différent. L'activation de Notch par son ligand Delta déclenche une cascade qui active les gènes *Hes*, qui influencent le destin cellulaire en empêchant l'expression des gènes proneuraux, et maintiennent les progéniteurs rétiniens dans un état prolifératif (Dorsky *et al.* 1997, Rapaport et Dorsky 1998, Gaiano et Fishell 2002, Wall *et al.* 2009). Son inactivation dans les progéniteurs précoces augmente la production de cellules précoces, comme les cônes (Dorsky *et al.* 1997, Jadhav *et al.* 2006, Jadhav *et al.* 2006). Tandis que son inhibition tardive, par la surexpression de *Numb*, augmente la production des types cellulaires tardifs, comme les bâtonnets (Dorsky *et al.* 1997, Cayouette 2003, Jadhav *et al.* 2006).



III. 7. Les modes de divisions des progéniteurs rétiniens et leur orientation

En plus de ces facteurs intrinsèques et extrinsèques nécessaires à la régulation du destin cellulaire ; dans la rétine, comme écrit dans la première partie de l'introduction, **l'orientation de la division cellulaire est capitale** pour la répartition des déterminants cellulaires entre les deux cellules filles, qui spécifieront leur destin cellulaire (Cayouette *et al.* 2001, Silva *et al.* 2002, Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005, Cayouette *et al.* 2006) (**figure 21**).

Un progéniteur oscille entre la décision de proliférer ou de sortir du cycle cellulaire pour se différencier. Au début du développement, leur nombre augmente grâce aux divisions symétriques formant deux progéniteurs (P/P) (**figure 7**). Pour former plus de neurones, ils se divisent symétriquement en deux neurones, ou cellules gliales, identiques (N/N), ou asymétriquement en un progéniteur plus un neurone (P/N), ou en deux neurones différents (Na/Nb) (Cayouette *et al.* 2001, Cayouette *et al.* 2006) (**figure 7**).

Dans les stades tardifs du développement de la rétine, le lien entre l'orientation du fuseau mitotique et le destin cellulaire des cellules filles est attesté par des études d'imagerie en temps réel de divisions de progéniteurs de rat (Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005) (**figure 21A-B**). 90% des divisions horizontales terminales (**figure 21A**) vont produire des types cellulaires similaires (**figure 21C**), tandis que 85% des divisions verticales (**figure 21B**) génèrent des types cellulaires différents (**figure 21C**) (Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005). La division horizontale répartit les déterminants cellulaires de façon équivalente entre les deux cellules filles (**figure 8 et figure 9**). La division verticale les répartit de façon asymétrique, seule une des deux cellules filles hérite du déterminant cellulaire NUMB par exemple (Kechad *et al.* 2012) (**figure 8 et figure 9**).



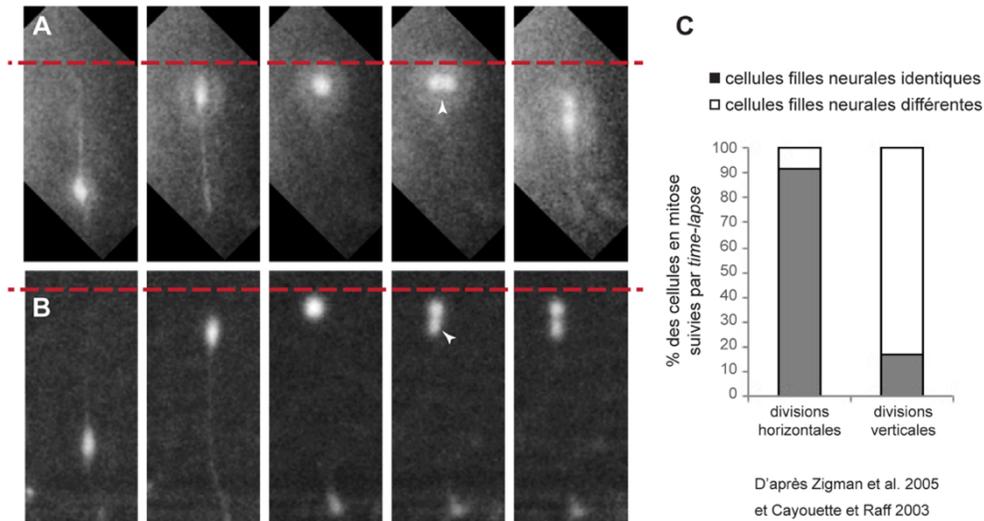


Figure 21. L'orientation du fuseau mitotique influence le devenir asymétrique des divisions cellulaires dans la rétine.

(A-B) Photos de l'enregistrement par imagerie en temps réel de l'orientation de la division (flèches blanches) des progéniteurs rétiniens de rat. Division horizontale (A) et verticale (B), relativement à la membrane apicale représentée par la ligne pointillée rouge. Modifié de (Zigman *et al.* 2005). (C) Quantification du devenir des cellules filles en fonction de l'orientation du fuseau mitotique. 90% des divisions horizontales terminales vont produire des types cellulaires identiques (gris). 85% des divisions verticales génèrent des types cellulaires différents (blanc). Ces données attestent le lien entre l'orientation du fuseau mitotique et le destin cellulaire des cellules filles dans la rétine en développement. Modifié de (Cayouette 2003).

Dans les stades précoces de la rétino-genèse chez les rongeurs, considérant le faible nombre de divisions verticales, elles ne semblent pas nécessaires pour former les divisions asymétriques formant un progéniteur plus un neurone (P/N) (Cayouette *et al.* 2001, Cayouette et Raff 2002, Silva *et al.* 2002, Cayouette *et al.* 2006). Par contre, aux stades postnataux de la rétino-genèse, environ 20% des progéniteurs s'orientent à la verticale pour former deux cellules postmitotiques différentes (Na/Nb) (Cayouette *et al.* 2001).

La régulation de l'orientation apico-basale des progéniteurs rétiniens chez le rat dépend de la protéine **mINSC** (Zigman *et al.* 2005). Nous ne savons pas comment sont localisées les protéines du complexe d'orientation du fuseau mitotique comme LGN et NuMA dans les progéniteurs rétiniens en division, ni même si les mécanismes décrits dans le cortex cérébral sont conservés dans la rétine.



IV. Objectifs d'étude

La rétine contient une **diversité** de types cellulaires qui résulte des **divisions cellulaires asymétriques**. Ces dernières sont observées dans la rétine de rat (Cayouette *et al.* 2001, Cayouette *et al.* 2003, Zigman *et al.* 2005), de souris (Kechad *et al.* 2012), de poulet (Silva *et al.* 2002) et de poisson-zèbre (Poggi *et al.* 2005).

En plus de mINSC, impliquée dans l'orientation verticale des progéniteurs rétiniens chez la souris (Zigman *et al.* 2005), quels sont les régulateurs de l'orientation de la division des progéniteurs rétiniens ? **Comment cette orientation est-elle régulée ?** Est-ce que les protéines LGN et NuMA sont localisées dans les progéniteurs rétiniens comme dans les progéniteurs neuraux du tube neural de poulet ou dans le cerveau antérieur de la souris, dans lesquels LGN et NuMA sont enrichis latéralement, sous forme de croissant cortical aux pôles du fuseau mitotique (Morin et Bellaïche 2011). Comment la localisation spatio-temporelle de LGN-NuMA est-elle régulée ?

Est-ce que les 20% de progéniteurs se divisant asymétriquement à la **verticale** aux environs de P0 (Cayouette *et al.* 2001) sont des divisions réservées à des types cellulaires particuliers ? Existe-t-il un régulateur des divisions cellulaires horizontales ? Quelle est la fonction des 3% de divisions cellulaires verticales observées aux stades embryonnaires rétiniens (Cayouette *et al.* 2001) ?

Cette thèse a commencé par l'identification d'un nouveau gène candidat à la régulation de l'orientation des progéniteurs en division : *suppressor APC domain containing 2* (**Sapcd2**), a.k.a. Ang, p42.3, *chromosome 9 open reading frame 140* (C9orf140), peu étudié jusqu'alors. Au début de ma thèse, SAPCD2 était seulement décrite comme une protéine plus fortement exprimée pendant la mitose, comme la protéine LGN, et qui est retrouvée surexprimée dans de nombreux tissus tumoraux et lignées cellulaires cancéreuses (Xu *et al.* 2007, Cui *et al.* 2011, Jung *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012, Sun *et al.* 2013, Yuan *et al.* 2013, Mao *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014, Weng *et al.* 2014).



V. Sapcd2

Le nom de la protéine *Suppressor APC domain 2* (**SAPCD2**) vient de son **domaine** *Suppressor APC (adenomatus polyposis coli)*, de la famille des domaines Pfam11414 (**figure 22**). La protéine est également composée d'un domaine *coiled-coil* en *C-ter*, d'un PRR, de nombreux sites potentiels de phosphorylation pour PKC, CK2, cAMP, ainsi qu'un motif *EF-hand* en *N-ter* (Murata *et al.* 2004, Xu *et al.* 2007) (**figure 22**). Des protéines *EF-hand* sont décrites comme impliquées dans le cancer (Xu *et al.* 2007). Le poids moléculaire de SAPCD2 est de 42,3 kDa, d'où son autre nom p42.3. La protéine contient 391 acides aminés et la taille de l'ADNc est d'environ 4 kb. Le gène est constitué de 6 exons et 5 introns et est **hautement conservé** de l'invertébré *Drosophile* à l'humain (Murata *et al.* 2004).



Figure 22. Structure de la protéine SAPCD2.

La protéine SAPCD2, d'un poids moléculaire de 42.3 kDa, est composée du domaine *EF-hand* en *N-ter*, du domaine suppresseur de APC et d'une terminaison *coiled-coil* en *C-ter*.

Le gène *Sapcd2* est décrit pour la première fois en 2004 avec le nom *Ang*, comme étant impliqué dans la **régionalisation du neuroectoderme antérieur**. Il a été isolé à partir d'une banque d'ADNc obtenus de cerveaux antérieurs de souris à E8-E8.5 (Murata *et al.* 2004). Chez la souris, l'expression de l'ARN *Sapcd2*, étudiée par des hybridations *in situ* sur embryon entier ou en sections, est détectée à partir de E7.5 dans le neuro-ectoderme. De E12.5 à E16.5, il est exprimé dans plusieurs régions du neuroépithélium, entre autres dans la zone ventriculaire, ainsi que dans de nombreux autres organes, comme l'intestin, le foie, les reins et les poumons (Murata *et al.* 2004) (**figure 23**).



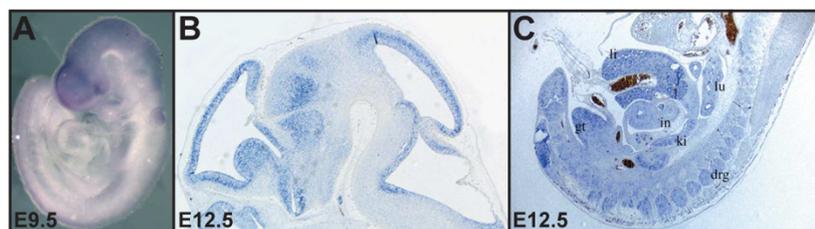


Figure 23. Expression embryonnaire de l'ARN Sapcd2.

Détection de l'ARN Sapcd2 par hybridation *in situ*, sur embryon entier ou en sections d'embryons de souris sauvages. **(A)** Expression dans la région caudale du neuropore à E9.5. **(B)** Expression dans les cellules non différenciées des zones ventriculaires, sur une coupe sagittale de cerveau à E12.5. **(C)** Expression dans les ganglions rachidiens (drg), dans le tubercule génital (gt), les intestins (in), le foie (li), les poumons (lu) et les reins (ki), sur une coupe sagittale d'embryon à E12.5. D'après (Murata *et al.* 2004).

Quelques années plus tard, le gène *Sapcd2* est identifié comme **oncogène**, impliqué à la fois dans la régulation du cycle cellulaire et la carcinogenèse de l'estomac (Xu *et al.* 2007, Cui *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012, Sun *et al.* 2013, Mao *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014, Weng *et al.* 2014). Puis en 2011, Jung *et al.* identifie *Sapcd2* comme un marqueur génique du cancer colorectal dans des tumeurs de patients, grâce à une méta-analyse bio-informatique de bases de données publiques, combinée à des validations cliniques de l'expression dans le tissu (Jung *et al.* 2011).

Comme de nombreux oncogènes, *Sapcd2* est exprimé dans plusieurs organes aux stades embryonnaires comme dans les poumons, la rate, l'estomac, le colon, le foie, le cerveau, l'intestin, les reins et n'est pas retrouvé chez l'adulte sain (Murata *et al.* 2004, Xu *et al.* 2007, Wan *et al.* 2014, Weng *et al.* 2014) (**figure 23**).

Chez l'humain, la protéine SAPCD2 est surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales et dans des tissus tumoraux primaires, prélevés de cancer gastrique (Xu *et al.* 2007, Cui *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012, Mao *et al.* 2014, Weng *et al.* 2014), du sein (cellules MCF-7 (Mao *et al.* 2014)), des poumons (cellules A549 (Mao *et al.* 2014)), du col de l'utérus, de glioblastome (Wan *et al.* 2014), d'adénocarcinome de la prostate (Wan *et al.* 2014), du cancer colorectal (Jung *et al.* 2011), de l'œsophage et du colon (liste dans (Mao *et al.* 2014)) et dans plusieurs lignées de carcinome hépatocellulaire (Sun *et al.* 2013).



L'expression de la protéine et de l'ARN de *Sapcd2* **dépend du cycle cellulaire** dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales humaines, avec une augmentation au début de la phase G1, un **pic d'expression pendant la mitose** et une diminution après la division cellulaire (Xu *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2012, Mao *et al.* 2014).

Quant à son **rôle**, *Sapcd2* est associé à la régulation de la mitose et est impliqué dans la prolifération cellulaire et la tumorigenèse. *In vivo* l'inhibition de l'activité de *Sapcd2* réduit la tumorigenèse dans des souris immunodéficientes et augmente leur survie (Xu *et al.* 2007, Weng *et al.* 2014). Cette inhibition diminue, voire arrête, la prolifération cellulaire, avec une accumulation des cellules en phases G2/M, une diminution de *cyclinB1* et une augmentation de *Chk2*, tous deux impliqués dans la régulation de la mitose. À l'inverse, la surexpression de SAPCD2 augmente la croissance tumorale, voire engendre une ségrégation anormale des chromosomes (Mao *et al.* 2014) et la survie des souris diminue (Sun *et al.* 2013, Weng *et al.* 2014). De par sa forte expression au début de la phase G1, SAPCD2 favorise la réentrée des cellules dans le cycle cellulaire. En 2011, Cui *et al.* ont découvert un microARN, miR-29a, capable d'inhiber l'expression de l'ARNm *Sapcd2* dans des lignées cellulaires de cancer de l'estomac humain (Cui *et al.* 2011).

Pour identifier des protéines potentiellement régulatrices de SAPCD2, Zhang *et al.* se sont basés sur les domaines EF-hand et *coiled-coil* de SAPCD2 pour réaliser leurs expériences (Zhang *et al.* 2012). D'après cette étude, la voie de signalisation la plus probable agissant sur SAPCD2 dans le cancer de l'estomac serait : protéine Ras - protéine Raf1 - kinase MEK - kinase MAPK - MAPK - tubuline - protéines du fuseau mitotique - protéines des centromères conduisant à une tumeur (Zhang *et al.* 2012). Dans des lignées cellulaires de cancer colorectal, les voies de signalisation MAPK, JAK/STAT et Wnt sont responsables de la surexpression de SAPCD2. Sa transcription peut être activée par EZH2, comme l'avait prédit Velichutina *et al.*, et par β -catenin, qui sont recrutées par STAT5 liée au promoteur de *Sapcd2* (Velichutina *et al.* 2010, Weng *et al.* 2014).



Basés sur ces informations d'expression de Sapcd2 et de sa potentielle voie de signalisation *via* des protéines du fuseau mitotique, nous faisons l'hypothèse que la protéine SAPCD2 puisse être impliquée dans la régulation de l'orientation de la mitose dans les tissus neuroépithéliaux.

VI. Projet de thèse

Dans les progéniteurs neuraux de souris et de poulet, le complexe PAR est situé au domaine apical, et la protéine Gai est localisée tout autour du cortex cellulaire, pourtant LGN et NuMA sont restreints au cortex cellulaire latéral. D'où vient cette contrainte spatiale ? **Quel est l'élément régulateur manquant ?** De plus, la majorité des divisions cellulaires rétiniennes sont symétriques au cours du développement, comment apparaissent les divisions asymétriques tardives, nécessaires à la génération de la diversité cellulaire ?

Nous connaissons le rôle déterminant de **LGN** dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique dans de nombreux contextes, comme présenté dans l'introduction, et son expression dans la couche proliférative de la rétine en développement (Raji *et al.* 2008). Dans la rétine, la protéine mINSC est décrite comme régulatrice des divisions verticales (Zigman *et al.* 2005), mais nous ne connaissons pas les régulateurs des divisions planaires. Comme il a été montré que dans les progéniteurs neuraux, LGN régule les divisions horizontales par sa localisation cortico-latérale, nous pensons qu'il pourrait être le régulateur des divisions planaires rétiniennes. Ne connaissant pas de régulateur protéique restreignant sa localisation au cortex cellulaire latéral, nous faisons l'hypothèse que SAPCD2, plus fortement exprimée en mitose, puisse être impliquée dans cette régulation. Ainsi nous avons étudié l'expression et la fonction de SAPCD2, en lien avec celles de LGN, dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique des divisions asymétriques des progéniteurs rétiniens. Pour étudier leurs rôles en fonction du changement d'orientation des progéniteurs au cours de la rétinogenèse, nous nous sommes intéressés à deux phases majeures du développement : précocement au cours de la phase de



prolifération des progéniteurs, à E14.5, et tardivement au cours de la phase neurogénique au premier jour postnatal, P0.

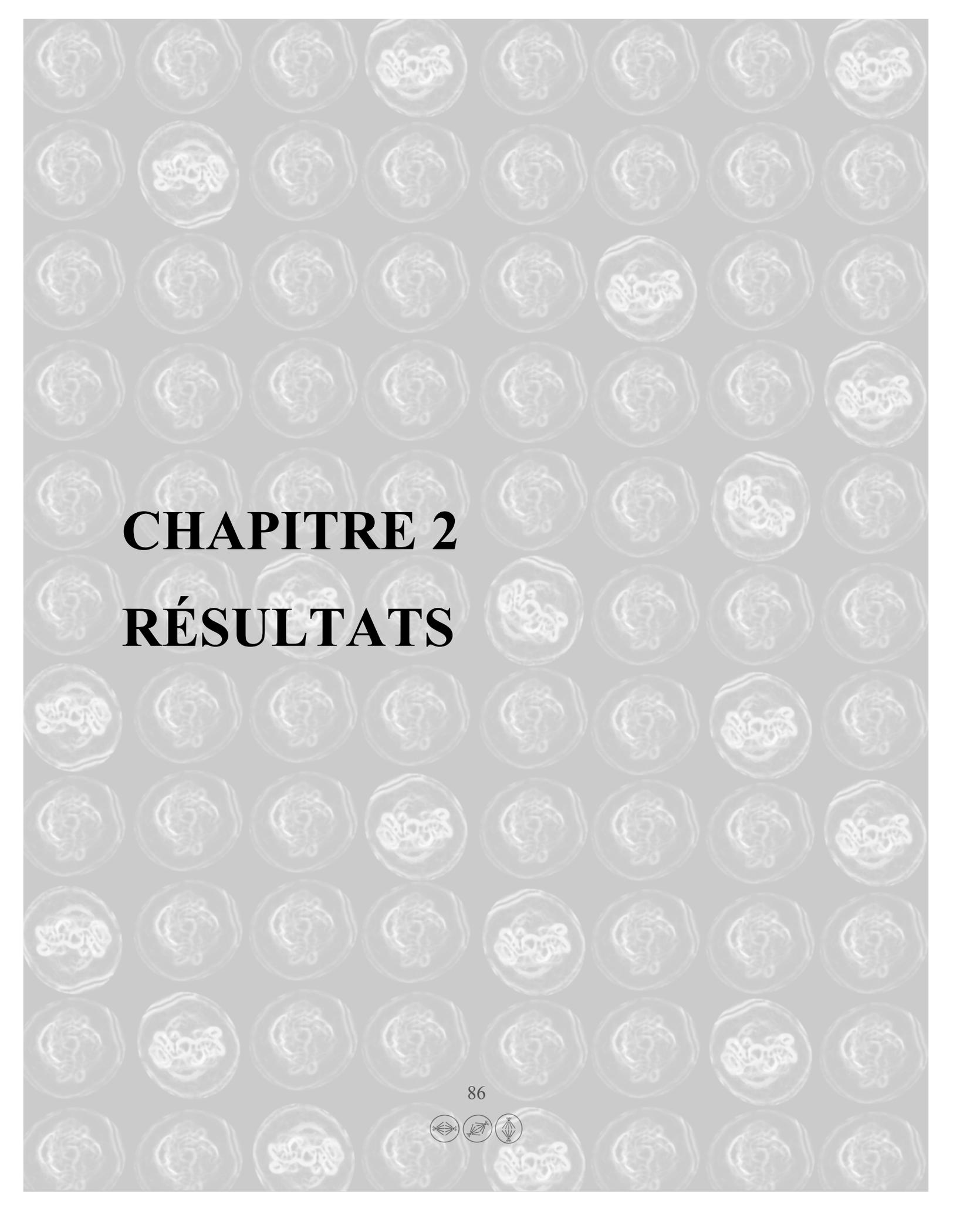
Pour étudier le rôle de *Sapcd2* dans la régulation de la division cellulaire asymétrique, nous utilisons la **souris mutante** décrite par Murata *et al.*, nommée *Sapcd2* $-/-$ dans cette thèse. Cette lignée a été produite par une approche de génétique conventionnelle, dans une souche de souris C57BL/6, dans laquelle 288 paires de bases de l'exon 1 ont été remplacées par une cassette *LacZ/Neo*. La souris mutante est viable, fertile et ne présente aucun défaut majeur à l'échelle macroscopique (Murata *et al.* 2004).

En **collaboration** avec l'équipe du Docteur Stéphane Angers, à Toronto, et en particulier avec Catherine Chiu, doctorante, nous avons découvert que SAPCD2 est un nouveau régulateur du complexe protéique responsable de l'orientation du fuseau mitotique Gai-LGN-NuMA. Notre étude est présentée dans le chapitre 2, sous la forme de l'**article publié** dans le journal *Developmental Cell* en janvier 2016 : "*SAPCD2 controls spindle orientation and asymmetric divisions by negatively regulating the Gai-LGN-NuMA ternary complex*" (Chiu *et al.* 2016). Le *preview* de l'article est en **annexe 4** (Li et Wang 2016).

Ces résultats sont corroborés par l'**étude du rôle de LGN** dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique des divisions planaires et terminales rétiniennes, menée en parallèle par Marine Lacomme, post-doctorante au laboratoire, et à laquelle j'ai participé. L'étude "*The LGN protein promotes planar proliferative divisions in the neocortex but apicobasal asymmetric terminal divisions in the retina*" a été **publiée** dans le journal *Development* en janvier 2016 (Lacomme *et al.* 2016). Certains résultats sont présentés dans le chapitre 3. L'article complet est en **annexe 3**.

Dans un second temps, nous avons cherché à comprendre le lien entre SAPCD2 et LGN à un stade de développement plus précoce. Pour cela, j'ai étudié, en **collaboration** avec Marine Lacomme, des rétines de **souris doubles mutantes** pour *Sapcd2* et *Lgn*, générées dans notre laboratoire. Les résultats sont présentés dans le chapitre 3.





CHAPITRE 2

RÉSULTATS



Chapitre 2 : Résultats sous forme d'article publié

Authors contributions

Figure 24 : Carine Monat

Figure 25 : Catherine Chiu

Figure 26A : Catherine Chiu

Figure 26B to 26L and 26R : Carine Monat

Figure 26M to 26Q : Marine Lacomme

Figure 27 : Catherine Chiu

Figure 28 : Carine Monat

Figure 29 : Carine Monat

Figure 30A to 30G : Catherine Chiu

Figure 30H and 30I : Carine Monat

Figure 31 : Carine Monat

Figure 32 (S1) : Catherine Chiu

Figure 33A, 33D and 33E (S2) : Catherine Chiu

Figure 33B and 33C (S2) : Carine Monat

Figure 34 (S3) : Carine Monat

Figure 35 (S4) : Carine Monat

Figure 36 (S5) : Catherine Chiu

Tableau II (annexe 1, table S1) : Catherine Chiu

Tableau III (annexe 2, table S2) : Catherine Chiu

Investigation : Catherine Chiu, Carine Monat, Mélanie Robitaille, Marine Lacomme, Avas Daulat, Graham Macleod

Cover : Carine Monat

Helen McNeil : writing review and editing, resources

Michel Cayouette and Stéphane Angers : conceptualization, writing original draft, writing review and editing, funding acquisition, supervision

SAPCD2 CONTROLS SPINDLE ORIENTATION AND ASYMMETRIC DIVISIONS BY NEGATIVELY REGULATING THE $G\alpha i$ -LGN-NuMA TERNARY COMPLEX

Authors and affiliations

Catherine Chiu*¹, Carine Monat*^{2,4}, Mélanie Robitaille¹, Marine Lacomme², Avais Daulat¹,
Graham Macleod¹, Helen McNeil³, Michel Cayouette^{2,4,5,7}, Stéphane Angers^{1,6,7}

*These authors contributed equally

¹Department of Pharmaceutical Sciences, Leslie Dan Faculty of Pharmacy, University of Toronto, ON M5S 3M2, Canada

²Cellular Neurobiology Research Unit, Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), Montreal, QC H2W 1R7, Canada

³Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Mt. Sinai Hospital, Toronto, ON M5G 1X5, Canada ;
Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON M5S 1A8, Canada

⁴Department of Medicine, Université de Montréal, QC H3T 1J4, Canada

⁵Department of Anatomy and Cell Biology and Division of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, QC H3A 0G4, Canada

⁶Department of Biochemistry, University of Toronto, ON M5S 1A8, Canada.

⁷co-corresponding authors :

stephane.angers@utoronto.ca

144 College Street

Toronto, ON, M5S 3M2

CANADA

416.978.4939

Michel.Cayouette@ircm.qc.ca

110, Avenue des Pins Ouest

Montreal, QC, H2W 1R7

CANADA

514.987.5757

Highlights

- SAPCD2 interacts with the $G\alpha i$ -LGN spindle orientation complex
- SAPCD2 is essential for planar divisions and proper cystogenesis in epithelial cells
- SAPCD2 is required for planar and symmetric terminal divisions in the mouse retina
- SAPCD2 controls division orientation by excluding LGN from the cell cortex



Résumé

Le contrôle de l'orientation de la division cellulaire est important pour la morphogenèse épithéliale et la division cellulaire asymétrique. Le complexe protéique ternaire $G\alpha$ i-LGN-NuMA est conservé au cours de l'évolution et connu comme ayant un rôle clef dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique. Sa localisation spatio-temporelle précise est déterminante pour orienter le fuseau mitotique. Pourtant la régulation de cette localisation spécifique est encore inconnue. Dans cet article, nous avons identifié un nouveau régulateur de LGN, SAPCD2 ou le suppresseur du domaine APC 2. Nous avons démontré que SAPCD2 est essentiel à la régulation des divisions planaires, aussi bien dans des cultures de cellules épithéliales que dans des cellules progénitrices rétiniennes *in vivo*. La perte de SAPCD2 engendre une randomisation de l'orientation du fuseau mitotique, qui perturbe la morphogenèse de cystes cultivés en 3D et triple le nombre de divisions cellulaires asymétriques terminales dans la rétine en développement. En termes de mécanisme, SAPCD2 compétitionne avec NuMA pour se lier à LGN, dont il régule négativement la localisation au cortex de la cellule. Ces résultats révèlent que SAPCD2 est un régulateur clef du complexe ternaire $G\alpha$ i-LGN-NuMA, identifié comme contrôleur de l'orientation du fuseau mitotique pendant la morphogenèse et la production des divisions cellulaires asymétriques.



Summary

Control of cell division orientation is integral to epithelial morphogenesis and asymmetric cell division. Proper spatiotemporal localization of the evolutionarily conserved $\text{G}\alpha\text{i-LGN-NuMA}$ protein complex is critical for mitotic spindle orientation, but how this is achieved remains unclear. Here we identify Suppressor APC domain containing 2 (SAPCD2) as a previously unreported LGN-interacting protein. We show that SAPCD2 is essential to instruct planar mitotic spindle orientation in both epithelial cell cultures and mouse retinal progenitor cells *in vivo*. Loss of SAPCD2 randomizes spindle orientation, which in turn disrupts cyst morphogenesis in 3D cultures, and triples the number of terminal asymmetric cell divisions in the developing retina. Mechanistically, we show that SAPCD2 negatively regulates the localization of LGN at the cell cortex, likely by competing with NuMA for its binding. These results uncover SAPCD2 as a key regulator of the ternary complex controlling spindle orientation during morphogenesis and asymmetric cell divisions.

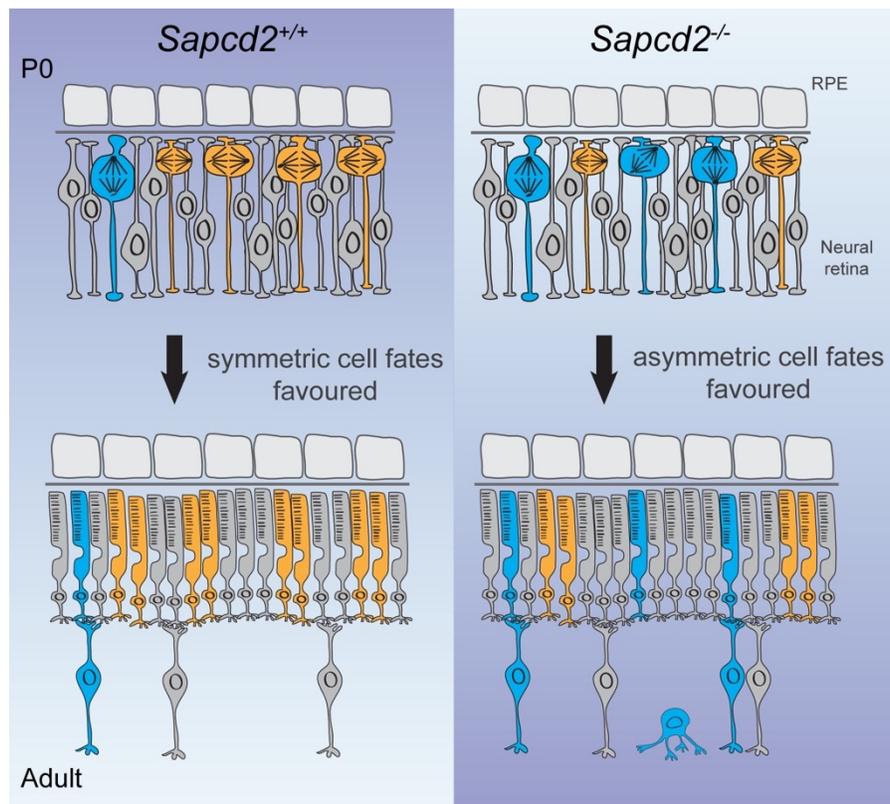


Figure 24. Graphical abstract



Introduction

The control of cell division orientation is critical for epithelial morphogenesis and asymmetric cell division during embryonic development and adult tissue homeostasis (Siller et Doe 2009). In various contexts, cell division orientation influences cell fate decisions. Genetic analysis in model organisms has identified the evolutionarily conserved G α i-LGN-NuMA ternary protein complex as essential molecules for the spatial capture of astral microtubules at the cell cortex to orient the mitotic spindle (Schaefer *et al.* 2000, Gotta *et al.* 2003, Du et Macara 2004, Couwenbergs *et al.* 2007, Nguyen-Ngoc *et al.* 2007). The GoLoco motifs on the C-terminus of LGN interact with GDP bound G α i, which is anchored at the plasma membrane through myristoylation. NuMA on the other hand, binds to the N-terminal tetratricopeptide repeat (TPR) of LGN and promotes G α i binding (Du et Macara 2004). One crucial role of the ternary complex is to serve as a cortical landing pad for the Dynein motor through direct NuMA binding, thereby generating minus-end directed forces on the aster microtubules necessary to orient the spindle (Kotak *et al.* 2012). While G α i appears to be uniformly distributed at the cell cortex, LGN is enriched in cortical crescents facing the spindle poles. How LGN localization is regulated spatiotemporally remains unclear.

In polarized epithelia, the orientation of the mitotic spindle is guided by intrinsic polarity cues and/or by extrinsic signals. The PARD3-PAR6 polarity complex is known to play a determining role in spindle orientation in multiple contexts. Molecular links connecting proteins involved in cell polarity with the G α i-LGN-NuMA complex have been identified in recent years. In *Drosophila* neuroblasts, for example, the adapter protein Inscuteable (mINSC in vertebrates) binds to the apically enriched polarity protein Bazooka (PAR3) and to Partner of Inscuteable (LGN) to localize the ternary complex apically and re-orient the position of the mitotic spindle vertically in the apico-basal direction (Schaefer *et al.* 2000, Yu *et al.* 2000). Whether planar or horizontal orientation of the mitotic spindle occurs by default in the absence of instructive polarity cues, or whether specific mechanisms exist to exclude the G α i-LGN-NuMA complex from the apical domain remains unclear, although recent studies have begun to shed light on this problem (Hao *et al.* 2010, Matsumura *et al.* 2012). It is known, however, that



localization and function of the ternary complex is context-dependent. For example, studies in the chick neural tube and the mouse forebrain have shown that the G α i-LGN-NuMA complex is essential to maintain planar (horizontal) divisions in neuroepithelial cells. In these cells, inactivation of LGN increases the frequency of vertical divisions, which alters progenitor positioning in the neuroepithelium (Morin *et al.* 2007, Konno *et al.* 2008). In the skin on the other hand, inactivation of LGN significantly decreases the frequency of vertical divisions without altering horizontal cell divisions (Williams *et al.* 2011).

The developing vertebrate retina has served as a model system to study the role of cell division orientation in cell fate decisions (Cayouette *et al.* 2006, Bassett et Wallace 2012). While most retinal progenitor cells (RPCs) divide with their mitotic spindle aligned parallel to the plane of the neuroepithelium (horizontal), some RPCs reorient their spindle to divide at perpendicular angles (vertical) during late stages of retinogenesis (Cayouette *et al.* 2001). Live imaging studies have shown that when rat RPCs divide with a vertical spindle, the division tend to be terminal and asymmetric, with the two differentiating daughter cells adopting different fates (Cayouette 2003). In contrast, when RPCs divide with a horizontal spindle, terminal divisions tend to be symmetric and give rise to two neurons of the same type. More recently, we provided evidence that NUMB, an antagonist of Notch signaling, is asymmetrically inherited in the daughter cells of vertical divisions, and essential for the production of terminal asymmetric cell divisions in the mouse retina (Kechad *et al.* 2012). Despite the apparent importance of division orientation in driving asymmetric fates in the developing retina, the mechanisms controlling spindle orientation in RPCs, and in vertebrate neuroepithelial cells in general, remain poorly understood.

Here we identify Suppressor APC domain containing 2 (SAPCD2; a.k.a. ang, p42.3, C9orf140), a poorly characterized cell cycle-dependent protein overexpressed in many human cancer cell lines (Xu *et al.* 2007, Sun *et al.* 2013, Yuan *et al.* 2013, Li *et al.* 2014, Mao *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014), as an LGN-interacting protein. SAPCD2 also interacts with several tight junction and polarity proteins and negatively regulates LGN localization. Our results demonstrate a critical role of SAPCD2 in controlling the orientation of the mitotic spindle during



epithelial morphogenesis and terminal divisions of retinal progenitor cells. This study therefore identifies a distinct negative regulator of the G α i-LGN-NuMA complex, providing a mechanism to balance the proportion of horizontal and vertical divisions, and consequently symmetric and asymmetric cell divisions.

Results

SAPCD2 associates with the G α i-LGN-NuMA ternary complex.

In a global effort to identify novel G α i effectors, we analyzed affinity purified complexes from cells expressing a SBP-HA-CBP-tagged version of the GTPase-defective Q204L-G α i1 mutant protein by mass spectrometry. Peptides corresponding to known G α i1 interactors such as various G β and G γ subunits of heterotrimeric G proteins, RIC8A and the GoLoco domain containing proteins AGS3 (GPSM1), LGN (GPSM2), RAP1GAP1 and RAP1GAP2 were identified. Intriguingly, several peptides corresponding to the poorly characterized protein SAPCD2 were also identified (**figure 25A and tableau II, annexe 1 (table S1)**). Reciprocal IP-MS analysis of anti-FLAG immunoprecipitates from cells expressing FLAG-SAPCD2 identified the GoLoco proteins AGS3 and LGN as well as several cell junction and polarity proteins such as PALS1 (MPP5), PATJ (INADL), MPDZ, ASPP2 (TP53BP2) and PAR3 (PARD3) (**figure 25A, tableau III, annexe 2 (table S2)**). We performed co-affinity purification experiments and showed that LGN and PARD3 were co-purified with SAPCD2 when isolated from HEK293T lysates expressing these proteins (**figure 25B and 32**).

The low number of SAPCD2 peptides identified in G α i pull-downs and the identification of AGS3 and LGN in SAPCD2 immunoprecipitates suggested that the interaction of SAPCD2 with G α i is indirect and likely bridged by AGS3/LGN. To examine this possibility more closely, we performed *in vitro* pull-down assays and determined that recombinant LGN, but not G α i, could precipitate SAPCD2 from lysates (**figure 25C**). Further domain mapping experiments revealed that recombinant SAPCD2 associates with the N-terminus of LGN containing the TPR repeat, suggesting direct interaction, but not with its C-terminus that contains the GoLoco motif (**figure 25D**). As LGN associates with NuMA through its TPR motif during spindle positioning

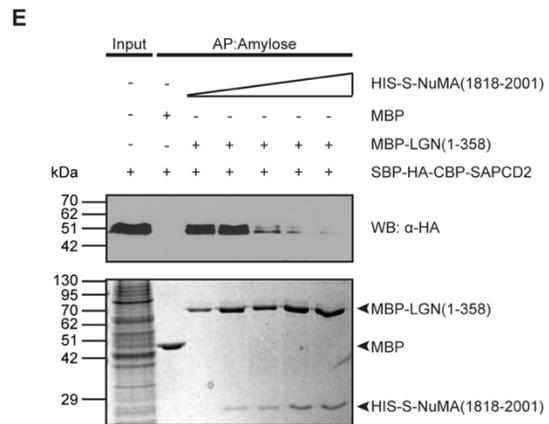
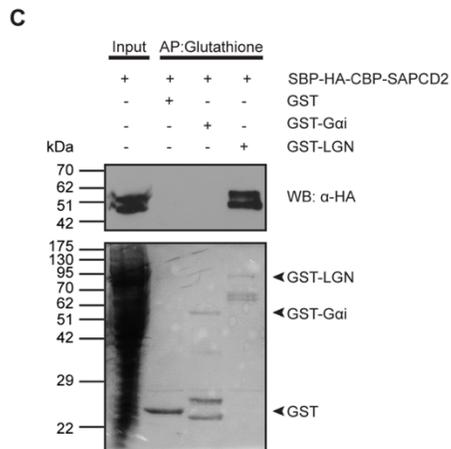
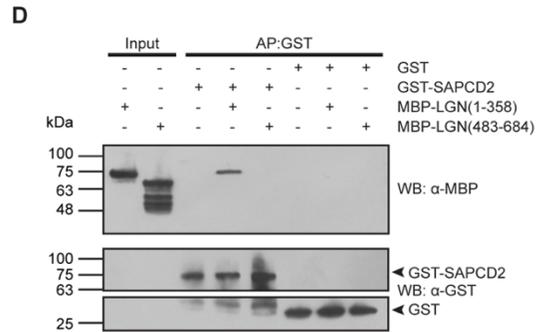
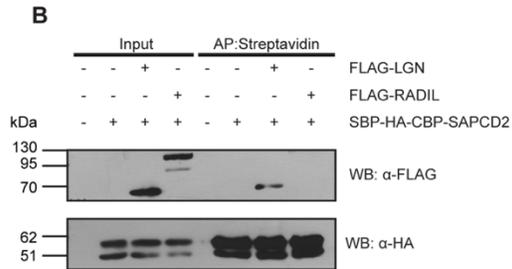
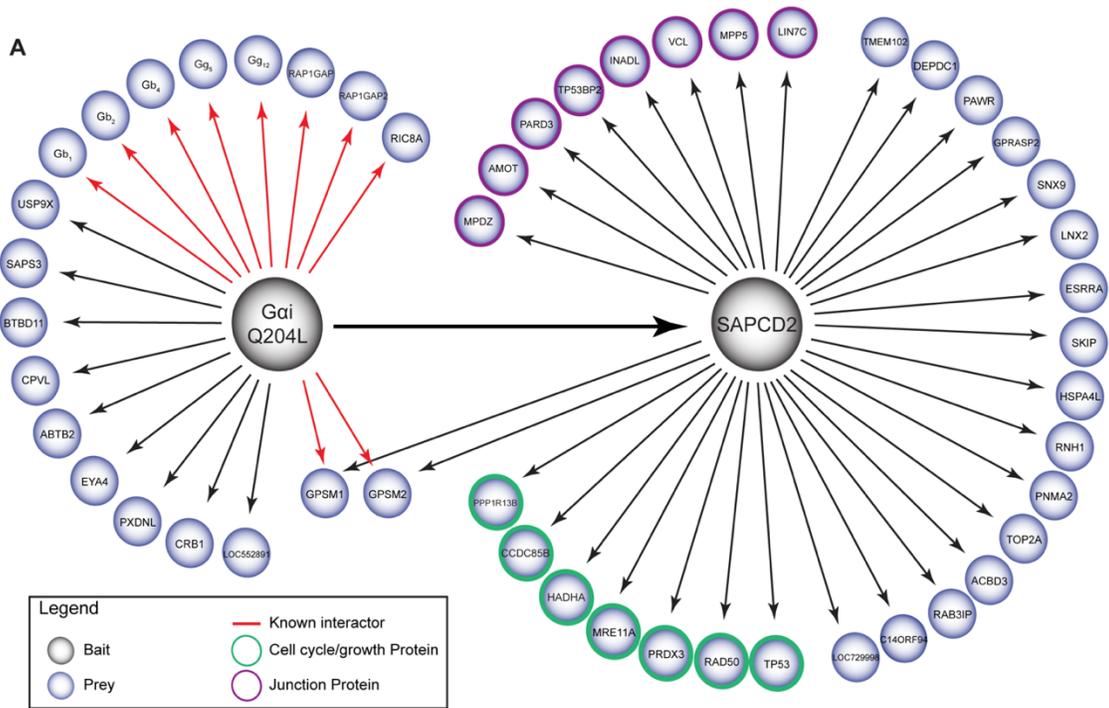


(Du *et al.* 2001), we next asked whether SAPCD2 and NuMA compete for binding to the TPR motif of LGN. Increasing concentration of a NuMA protein encompassing amino acids 1818-2001 (LGN binding region) led to dose-dependent inhibition of SAPCD2 binding to LGN (**figure 25E**). We conclude that SAPCD2 interacts with the same binding site as NuMA on the TPR domain of LGN.

Figure 25. SAPCD2 interacts with the Gai-LGN complex.

(A) Protein-protein interaction network showing the identification of SAPCD2 protein found in complex with Gai-Q204L, GSPM1 (AGS3) and GSPM2 (LGN). Mass spectrometry analysis of SAPCD2 affinity-purified complexes identified many proteins localized at tight junctions and involved in cell polarity. See (**tableau II, annexe 1 (table S1) and tableau III, annexe 2 (table S2)**) for full list of identified proteins. **(B)** SBP-HA-CBP-SAPCD2 co-affinity precipitates with FLAG-LGN. HEK293T cells were transfected with the indicated plasmids. Lysates were subjected to affinity purification with streptavidin resin. Bound proteins were resolved with SDS-PAGE and blotted with HA and FLAG antibodies. Inputs are 10% of lysate used in affinity purification. **(C)** SAPCD2 binds to LGN but not Gai. The indicated recombinant GST-fusion proteins were incubated with lysate from HEK293T cells stably expressing SBP-HA-CBP-SAPCD2. Top panel is Western blotting using anti-HA antibodies and shows strong SAPCD2 binding to LGN but not Gai. Bottom panel shows Ponceau S staining of the same Western blot membrane as loading control. Input is 10% of lysate used in affinity purification. **(D)** SAPCD2 binds to the TPR-motif of LGN. Recombinant GST or GST-SAPCD2 were incubated with purified recombinant MBP-tagged LGN(1-358) and LGN(483-684) proteins. Proteins were detected by Western blot with indicated antibodies. **(E)** *In vitro* competition binding assay shows NuMA dose-dependently inhibits interaction of SAPCD2 with the N-terminus of LGN. Bottom panel is the Coomassie Blue stain for NuMA binding and amounts of LGN N-termini proteins purified. Input is 12% of lysate used in affinity purifications. SBP, Streptavidin-binding affinity tag; HA, hemagglutinin; CBP, calmodulin-binding affinity tag. See also **figure 32**.





SAPCD2 is a cell cycle-regulated protein localized at the apical membrane of mouse retinal progenitor cells.

To study SAPCD2, we developed an affinity-purified polyclonal antibody. Validating the antibody, staining was lost in HEK293T *SAPCD2* *-/-* cells engineered using CRISPR-Cas9 gene editing and in *Sapcd2* *-/-* retinal tissue (**figures 33A and 33B**). Furthermore, using this antibody, two bands of approximately 42 kDa were detected by western blotting of lysates extracted from heterozygotes mouse retinas, but not from *Sapcd2* *-/-* mice (**figure 33C**).

SAPCD2 was previously identified as a cell cycle-dependent gene overexpressed in many primary human tumours, cell lines, and in embryonic tissues (Xu *et al.* 2007, Sun *et al.* 2013, Yuan *et al.* 2013, Li *et al.* 2014, Mao *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014). Consistent with SAPCD2 having a role during mitosis, its expression was tightly regulated during HeLa cell cycle, with minimal expression in interphase and maximal expression in M phase coinciding with peak expression of CYCLINB1 (**figure 26A**). This periodicity in protein expression is supported by cDNA microarray analysis revealing SAPCD2 as one of the top periodic gene expressed during the cell cycle (Whitfield *et al.* 2002) (www.cyclebase.org). Interestingly, the slower migrating form of SAPCD2 was enriched during M phase. The precise nature and functional importance of this cell cycle dependent modification are currently being investigated but further implies a mitosis specific role. Strikingly, LGN was similarly identified as a cell-cycle regulated gene and parallels SAPCD2 mRNA and protein abundance (Du et Macara 2004).

To study the role of SAPCD2 *in vivo*, we used the mouse retina as a model system. We first analyzed SAPCD2 protein expression in retinal extracts and found strong expression during active phases of progenitor proliferation from E14 to P2, lower expression by P7, and undetectable expression in adult extracts (**figure 26B**). Next, we took advantage of a previously generated mouse line in which a *lacZ/neo* cassette is inserted at the start codon of the *Sapcd2* locus (Murata *et al.* 2004), allowing us to use β -Galactosidase activity to report *Sapcd2* expression. Consistent with the Western blot results, β -Gal activity was mostly concentrated in the progenitor cell layer from E14.5 to P3, although some β -Gal activity was also observed in differentiating neurons (**figure 26C**). By P7, when most neurons are undergoing differentiation,



β -Gal activity was still detected in all three neuronal layers of the retina, but was largely extinguished in adult stage, when all neurons are fully differentiated, although a rare population of neurons in the amacrine cell layer was still positive (**figure 26C**). We conclude that SAPCD2 expression peaks during mitosis and is expressed in RPCs and newly differentiated neurons but not in mature retinal cells.

We next determined the subcellular localization of SAPCD2 in RPCs at P0. In interphase RPCs, SAPCD2 is clearly enriched at the apical surface (**figure 26D**). In horizontally-dividing RPCs, SAPCD2 labelling varied according to the phase of mitosis, showing a clear concentration at the apical pole in prophase and metaphase (**figures 26E and 26F**), but barely detectable in anaphase/telophase (**figure 26G**). In vertically-dividing RPCs, however, SAPCD2 was undetectable at all phases of mitosis and was never concentrated at the apical pole (**figures 26H and 26I**). To provide further support for these immunostaining results, we electroporated P0 RPCs *in vivo* with a plasmid coding for a SAPCD2::mCherry fusion protein and analyzed its localization 24 hours later. Consistent with our immunostaining data, SAPCD2::mCherry localized to the membrane in interphase RPCs and was enriched at the apical end foot (**figure 26J**). In prophase RPCs, SAPCD2::mCherry was concentrated at the apical pole (**figure 26K**). Quantification of SAPCD2 localization revealed that 84.7% of prophase/metaphase RPCs exhibit apical SAPCD2 in P0 retinas (**figure 26L**). Conversely, LGN (**figures 26M-26O**) and NuMA (**figure 26R**) were observed in a complementary expression pattern to SAPCD2 in RPCs, localizing to the lateral membrane and not the apical domain in horizontally-dividing cells, whereas LGN invaded the apical pole in vertically-dividing RPCs (**figures 26P and 26Q**), in which SAPCD2 is not detected.



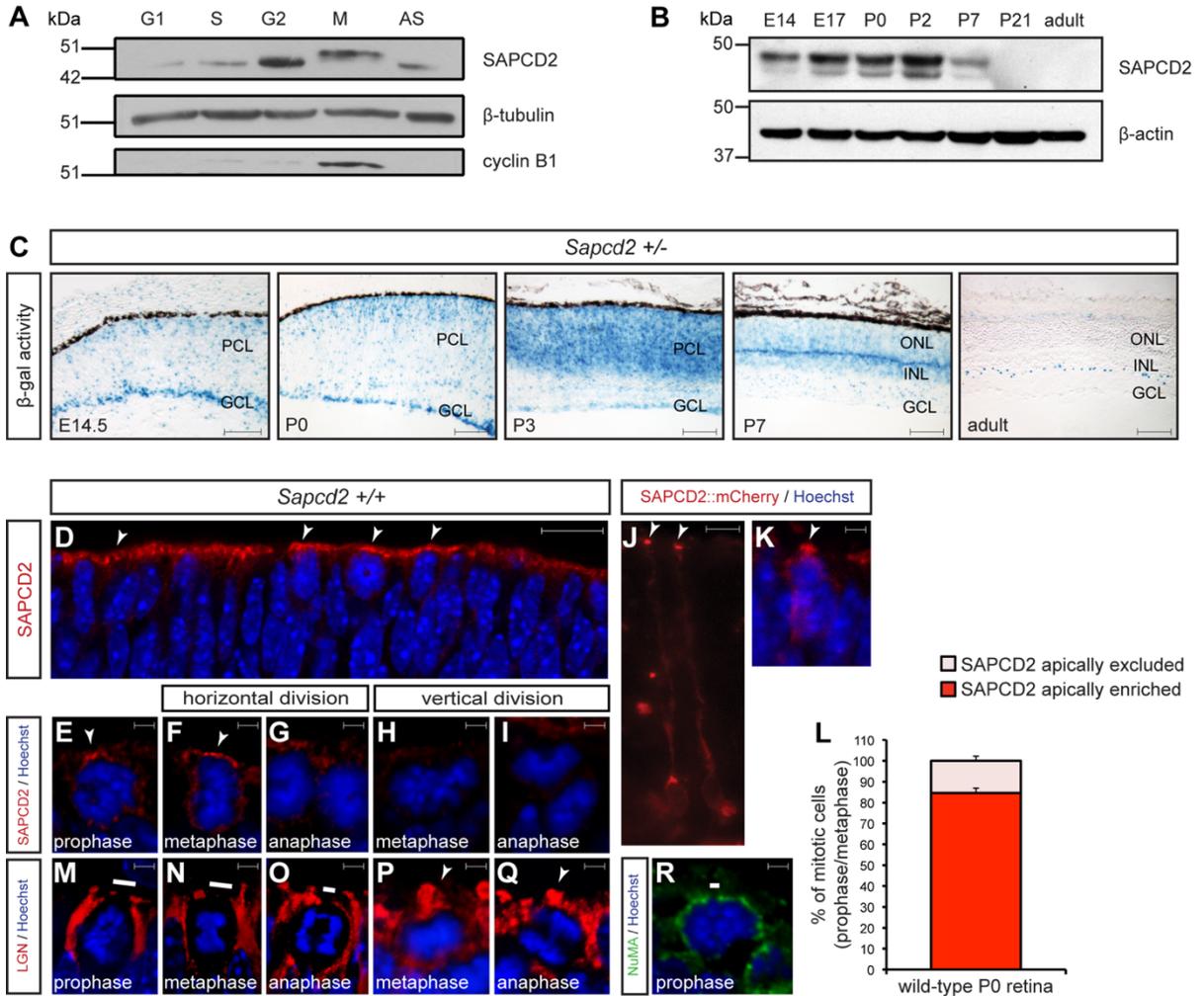


Figure 26. SAPCD2 is expressed in mitosis and localizes to the apical domain in mouse retinal progenitors.

(A) SAPCD2 expression in HeLa cells synchronized and collected at different phases of the cell cycle. SAPCD2 expression peaks in G2/M; cyclin B1 is used to indicate the M phase. (B) SAPCD2 expression in mouse retina lysates at different stages of development. SAPCD2 expression correlates with the period of retinal cell proliferation. (C) X-gal staining on *Sapcd2* +/- heterozygous mice reports *Sapcd2* expression. E, embryonic day; P, postnatal day; PCL, progenitor cell layer; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar : 50 μm. (D-I) Immunofluorescence staining for SAPCD2 in wild-type mouse retina at P0. Confocal image shows SAPCD2 enriched at the apical end foot in interphase RPCs (D, arrowheads). Scale bar : 10μm. In prophase (E) and horizontal metaphase cells (F), SAPCD2 is found at the apical pole (arrowheads), whereas it is not detected in horizontal anaphase (G), or vertically dividing cells at any stage (H-I). Scale bar : 1 μm. (J, K) SAPCD2::mCherry fusion localizes around the membrane and concentrates to the apical end-feet in interphase cells (J, arrowheads) and at the apical pole in prophase cells (K, arrowhead). Scale bar (J) : 10 μm, (K) : 1 μm. (L) Quantification of SAPCD2 localization in prophase (E) and horizontal metaphase



(F) at P0 in wild-type mice retina. Four animals (n=215 dividing cells) were analyzed. 84.65% of prophases show apical SAPCD2 localization (dark red). Error bars represent SEM. **(M-R)** Immunofluorescence for LGN (M-Q) and NuMA (R) on a wild-type mouse retinal section at P0. Both LGN and NuMA localize to the lateral membrane in prophase and horizontal mitotic cells, but are excluded from the apical domain (white line). In vertical divisions, LGN is found at the apical domain (P, Q, arrowheads). Nuclei are stained with Hoechst (blue). Scale bar : 1 μ m. See also **figure 33**.

SAPCD2 regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis.

The association of SAPCD2 with the LGN-G α i complex and with several apical polarity proteins raised the possibility that it could be involved in regulating spindle orientation. Since the LGN- G α i-NuMA ternary complex plays an important role in spindle orientation and lumen formation during cystogenesis in the organotypic 3D cultured MDCK cell system (Rodriguez-Fraticelli *et al.* 2010, Zheng *et al.* 2010), we decided to first study SAPCD2 function in this assay. Because our SAPCD2 antibody does not recognize the canine protein, we transfected low levels of human *SAPCD2* in MDCK cells and studied its localization in polarized MDCK cell monolayers. Consistent with our findings in RPCs, SAPCD2 was also apically localized in this context and enriched at tight junctions (**figure 33D**). To determine if SAPCD2 plays a role in cystogenesis, we knocked down its expression in MDCK cells and examined cyst morphogenesis 5 days later. As expected, the majority of MDCK cells expressing control shRNA formed spherical cysts with a single hollow lumen. In contrast, *SAPCD2* depletion using two independent and validated shRNAs led to abnormal cysts exhibiting multiple lumens (**figures 27A and 27B**). The cystogenesis defects of *SAPCD2* shRNA expressing cells were comparable to defects obtained when *LGN* expression was knocked down (**figures 27A and 27B**).

To determine whether the multi-lumen cyst phenotype observed when knocking down *SAPCD2* was a consequence of spindle orientation defects, we calculated the angle of the mitotic spindles with respect to the apical membrane by staining the cells for TUBULIN to detect the mitotic spindle and phalloidin to label the apical membrane. Cells were plated in Matrigel immediately following transfection with the shRNAs to allow cysts to form before significant *SAPCD2* knockdown was achieved. Under these conditions, most cysts exhibited a single lumen

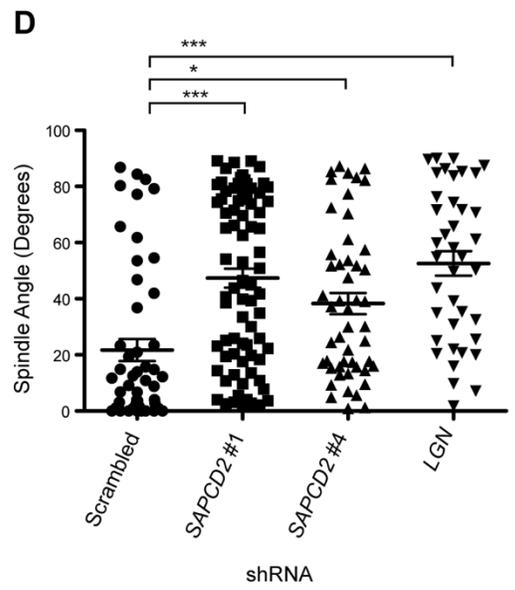
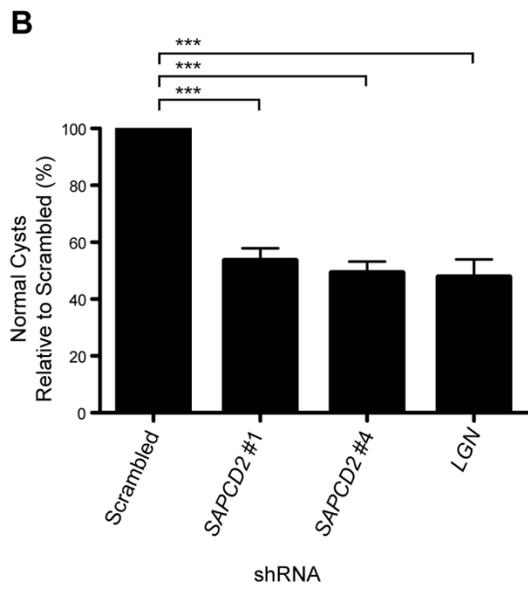
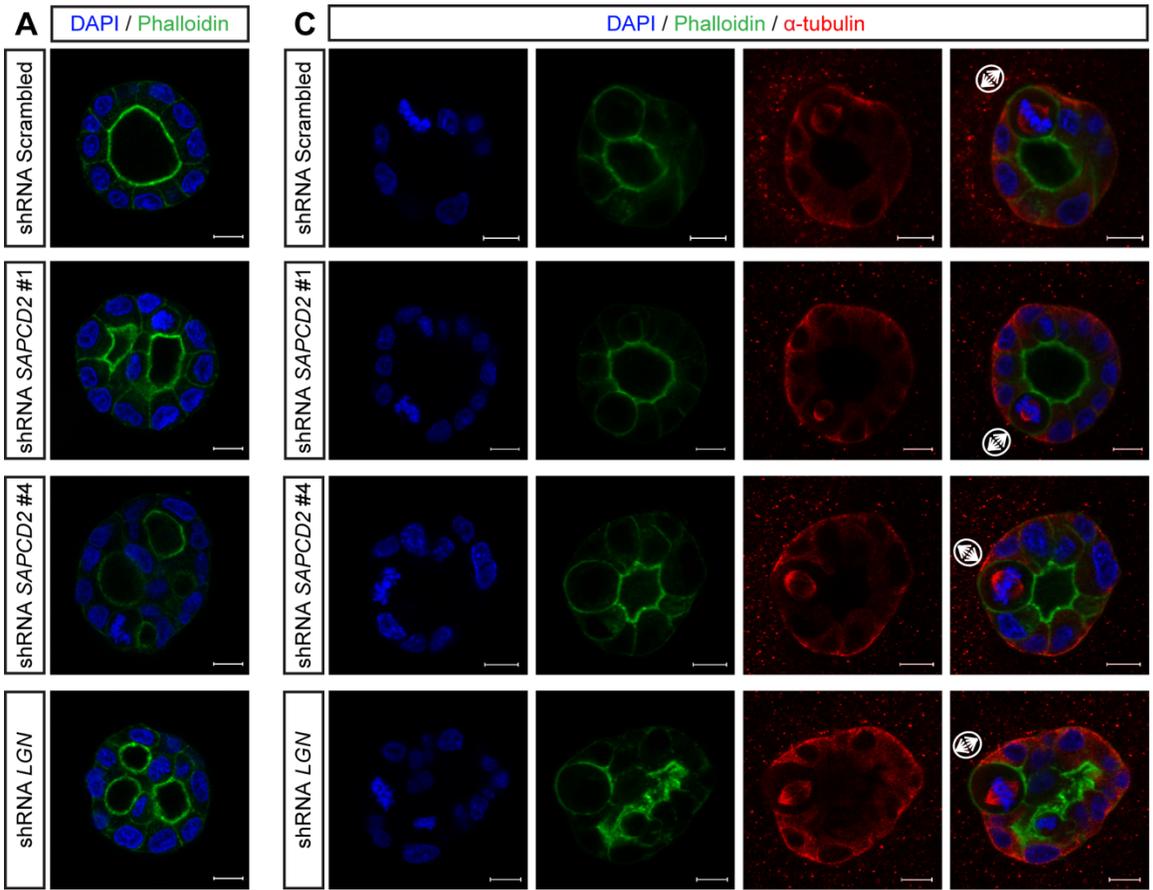


when observed 3 days after plating. In cysts expressing control shRNA, the spindles were generally parallel to the apical membrane (**figures 27C and 27D**). However, cysts derived from cells expressing either *SAPCD2* shRNAs had randomized mitotic spindle orientations with many spindles being oblique or even perpendicular to the apical membrane (**figures 27C and 27D**). These results were similar to what is observed when cysts are depleted of *LGN* (**figures 27C and 27D**). We conclude that *SAPCD2* is required to properly orient the mitotic spindle parallel to the apical membrane during epithelial morphogenesis.

Figure 27. SAPCD2 is required for epithelial morphogenesis in MDCK cysts.

(A) *SAPCD2* knockdown leads to multiple lumen formation. Confocal images show the middle plane of MDCK cysts derived from cells infected with the indicated shRNA. DAPI (blue) and phalloidin (green). **(B)** Quantification of the percentage of normal, single-lumen cysts formed in each condition normalized to control (scrambled shRNA). *** $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Bonferroni test. **(C)** *SAPCD2* knockdown disrupts mitotic spindle orientation. Confocal images showing mitotic cells within cysts stained with the indicated antibodies. **(D)** Scatter plot showing spindle angles measured in metaphase cells from each shRNA condition shown in (C). Measurements are taken by measuring the angle difference between the basal plane of the cell and the spindle pole axis. In (A) and (C), scale bar shows 10 μm , and in (B) and (D), error bars represent the SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0001$, one-way ANOVA and Bonferroni test.





SAPCD2 is required for planar cell division in the mouse retina.

To uncover SAPCD2 function *in vivo*, we studied the retina of homozygous *lacZ* knock-in mice (*Sapcd2* $-/-$), which were previously reported to be null mutants for *Sapcd2* (Murata *et al.* 2004). In light of our findings in the cyst assay in 3D MDCK cultures, we predicted that SAPCD2 would be required to control cell division orientation in RPCs. We therefore analyzed mitotic spindle orientation in three dimensions by staining the DNA and centrosomes (**figures 28A-B**), as previously described (Cayouette *et al.* 2001, Juschke *et al.* 2014). Spindle orientation was analyzed at P0, a stage when the number of vertically oriented divisions peaks in the retina (Cayouette *et al.* 2001). Strikingly, while most divisions were expectedly aligned horizontally in controls, the proportion of oblique and vertical divisions was increased by almost 6-fold in *Sapcd2* $-/-$ retinas (**figure 28C**). Together, these results indicate that SAPCD2 function is required to orient RPC mitotic spindles horizontally, or parallel to the plane of the neuroepithelium.

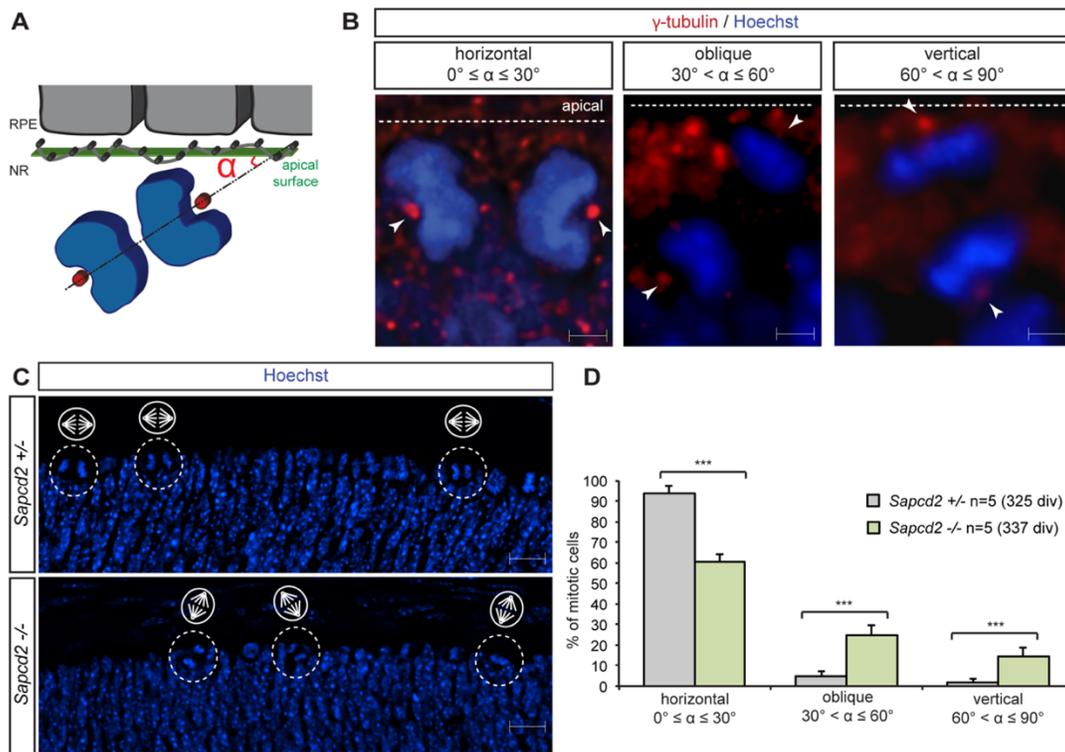


Figure 28. SAPCD2 is required for planar cell divisions in the mouse retina.

(A) Schematic representation of the method used to analyze mitotic spindle angles in RPCs *in vivo*. Using three-dimensional coordinate geometry, the angle (α) between the spindle axis, identified from the x, y, and z coordinates of the centrosome pairs, and the plane of the neuroepithelium (corresponding to the



interface between the retinal pigmented epithelium (RPE) and the neural retina (NR)) was measured in tissue sections. Angles of 0°-30° were classified as horizontal, whereas angles of 30°-60° and 60°-90° were classified as oblique and vertical, respectively. **(B)** Examples of horizontal, oblique and vertical divisions in the mouse retina at P0. Sections were stained for γ -tubulin to visualize the centrosomes (red; arrowheads) and Hoechst to visualize DNA (blue). Scale bar : 1 μ m. **(C)** Low magnification images of heterozygote and *Sapcd2*^{-/-} retinas at P0, showing a visible increase of vertical and oblique divisions in the *Sapcd2*^{-/-} animals. Mitotic spindle angles are schematized above each mitotic cell (dotted circles). Scale bar : 5 μ m. **(D)** Quantification of the distribution of mitotic spindle orientations of RPCs in anaphase/telophase at P0 in heterozygotes (grey) and *Sapcd2*^{-/-} (green). Five heterozygotes (n=325 dividing cells) and five *Sapcd2*^{-/-} (n=337 dividing cells) were analyzed. Error bars represent standard deviations between animals. *** p \leq 0.001, Student's t-test.

SAPCD2 is required for terminal symmetric cell divisions in retinal progenitors.

Previous studies have suggested that horizontally-dividing RPCs producing a terminal division tend to give rise to two photoreceptor cells, whereas vertically-dividing RPCs tend to give rise to an asymmetric terminal division producing a photoreceptor and another cell type (Cayouette 2003, Kechad *et al.* 2012). Based on our finding that loss of SAPCD2 increases vertical divisions in the mouse retina, we predicted that asymmetric terminal divisions would be increased in *Sapcd2*^{-/-}, at the expense of symmetric terminal divisions. To test this idea, we analyzed the lineage of individual RPCs by infecting *Sapcd2*^{-/-} or control heterozygote littermate retinal explants at E18.5 with a retroviral vector expressing GFP. Fourteen days later, when all the cells have differentiated, we studied the composition of the resulting clones using cell-specific markers and examining the position and morphology of the cells in the layers to identify the different retinal cell types (**figures 29A-29C**). In *Sapcd2*^{-/-} retinas, overall clone size distribution was indistinguishable from control clones (**figure 29D**), indicating that loss of SAPCD2 does not alter proliferation or cell death during retinal development. Consistently, staining for phospho-histone H3 and activated Caspase-3 at P0 revealed no significant changes in *Sapcd2*^{-/-} retinas, and hematoxylin/eosin staining did not reveal any obvious alteration of cell layer thickness (**figures 34A-34C**). Moreover, the localization of PARD3, PALS1 and ZO-1 were unchanged in *Sapcd2*^{-/-} retinas, ruling out a defect in the establishment or maintenance of tissue polarity (**figure 34D**).

To precisely test our hypothesis that loss of SAPCD2 would lead to an over production of terminal asymmetric divisions, we next focused our attention on the composition of 2-cell



clones, which represent the output of a terminal division. In control animals, 86% of terminal divisions were symmetric, producing two photoreceptor cells, whereas the remaining divisions were asymmetric and gave rise to a photoreceptor and a bipolar, amacrine, or Müller glial cell (**figure 29E**). These results are largely consistent with the proportion of horizontal (93%) and oblique/vertical (7%) divisions observed in heterozygous retinas at this stage (**figure 28D**). In contrast, only 77% of terminal divisions observed in *Sapcd2*^{-/-} retinas were symmetric and produced two photoreceptors, 23% were asymmetric and produced a photoreceptor and a bipolar, amacrine, or Müller cell (**figure 29E**), which is also consistent with the increase in oblique/vertical divisions observed in *Sapcd2*^{-/-} (**figure 28D**). In further support of these results, similar results were obtained when using retrovirus-mediated shRNA knock-down of *Sapcd2* in RPCs (**figure 35**). Importantly, loss of SAPCD2 did not affect the localization of NUMB in mitotic RPCs (**figure 34E**), ruling out the possibility that NUMB mislocalization leads to alterations in symmetric and asymmetric terminal divisions in *Sapcd2*^{-/-}. Thus, SAPCD2 is essential in RPCs to orient the mitotic spindle horizontally and promote the production of symmetric terminal divisions generating two photoreceptor cells.

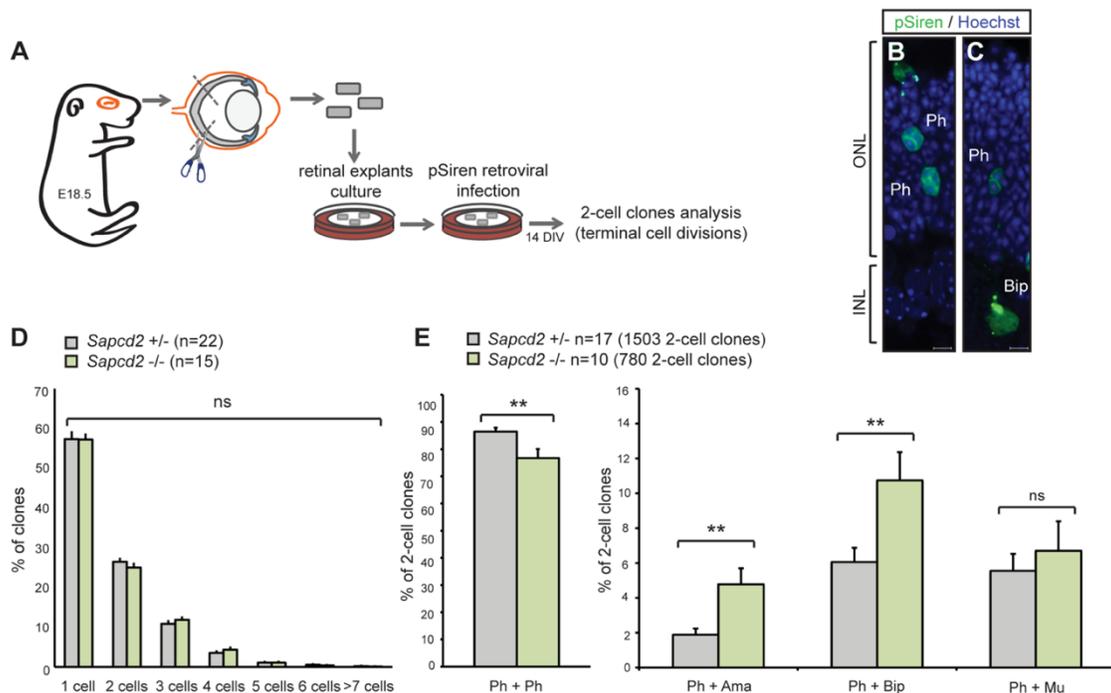


Figure 29. SAPCD2 is required for terminal symmetric cell divisions in the developing mouse retina.



(A) Schematic representation of the clonal analysis assay. (B-C) Examples of confocal images exhibiting 2-cell clones corresponding to terminal cell divisions obtained 14 days after infection with *ZsGreenpSiren* retroviral vector showing a two-photoreceptor cell clone (B) and a clone containing one photoreceptor and one bipolar cell (C). Scale bar : 5 μ m. (D-E) Graphs showing quantification of clonal analysis of retinal explants infected with the retroviral vector at E18.5 and analyzed 14 days later in heterozygotes (grey) and *Sapcd2* $-/-$ (green) retinas. Clone size distribution (D) is not significantly (ns) altered in heterozygotes (n=22) compared to *Sapcd2* $-/-$ retinas (n=15). Two-cell clones composition (E) shows a significant reduction of symmetric cell divisions producing two photoreceptors and an increase of asymmetric cell divisions producing one photoreceptor and one bipolar or amacrine cell (n=17 heterozygous mice, 1503 two-cell clones analyzed; n=10 *Sapcd2* $-/-$, 780 two-cell clones analyzed). Error bars represent SEM. **p \leq 0.01; Student's t-test. Ph, photoreceptor cells; Ama, amacrine cells; Bip, bipolar cells; Mu, Müller glia; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Data was obtained from seven different litters in independent experiments. See also **figures 34 and 35**.

SAPCD2 regulates the cortical localization of LGN.

We next wondered how SAPCD2 could control spindle orientation. Proper spatiotemporal localization of the G α i-LGN-NuMA force-generating ternary complex is needed to localize the mitotic spindle during oriented cell division. Since SAPCD2 and NuMA share the same binding site on LGN (**figure 25E**), we predicted that SAPCD2 expression might interfere with the cortical localization of LGN. To test this possibility, we first determined the effect of SAPCD2 overexpression on the localization of LGN in HeLa cells engineered to stably express low levels of a GFP::LGN fusion (Kiyomitsu et Cheeseman 2012). As previously described, during mitosis, these cells exhibit cortical expression of GFP::LGN in a crescent opposite the spindle poles (**figure 30A**). Upon overexpression of SAPCD2, which localizes to the cortex in HeLa cells (**figure 33E**), the abundance of cortical GFP::LGN was significantly reduced whereas overexpression of G α i, the plasma membrane anchor for LGN, led to expansion of the LGN crescent and increase in overall GFP::LGN intensity (**figure 30B**). In contrast, knocking out SAPCD2 expression using the CRISPR-Cas9 system led to increased cortical LGN expression (**figures 30C-E**). Since ectopic G α i expression increases LGN cortical localization, we next asked whether SAPCD2 co-expression would rescue this phenotype. Whereas expression of G α i enhanced cortical expression of LGN, SAPCD2 expression in the same cells inhibited this effect (**figures 30F-G**). As control we showed that SAPCD2



overexpression had no effect on the localization of G α i (**figure 36**). We conclude that SAPCD2 negatively regulates the cortical localization of LGN.

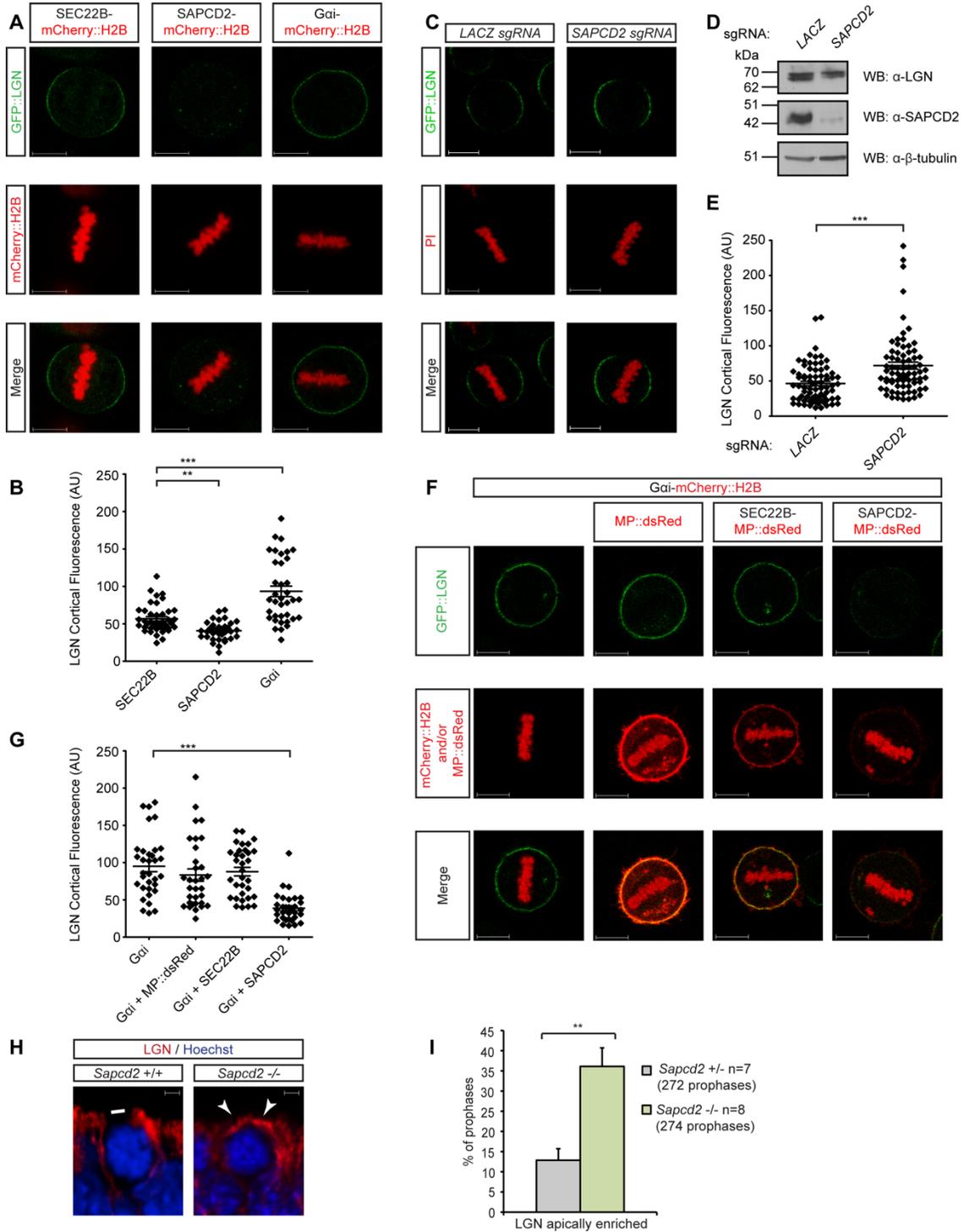
In **figure 26**, we established that SAPCD2 expression is generally non-overlapping with LGN and NuMA in RPCs. Since expression of SAPCD2 influences LGN cortical expression, we next hypothesized that apical expression of SAPCD2 in RPCs might function to exclude LGN from the apical domain and thereby serve to maintain its lateral expression during horizontal divisions. We thus predicted that LGN localization would be altered in *Sapcd2* $-/-$ RPCs. Consistently, while LGN localized to the apical pole in only 13% of heterozygotes RPCs, it invaded the apical domain in 36% of *Sapcd2* $-/-$ RPCs during prophase (**figures 30H-I**). At this point, however, we cannot formally exclude that the LGN-related protein AGS3 also contributed to this observation since all four LGN antibodies that we tested were found to also recognize AGS3 (not shown). A remarkable correlation nevertheless exists between the increased apical localization of LGN in *Sapcd2* $-/-$ RPCs in prophase (36%) and the increased number of oblique and vertical divisions leading to asymmetric divisions (39.5%). We conclude that the apical expression of SAPCD2 during mitosis is required to prevent LGN anchoring at the apical cortex, and consequently maintain horizontal divisions.

Figure 30. SAPCD2 regulates LGN cortical localization.

(A) HeLa cells stably expressing GFP::LGN were transfected with a bicistronic vector enabling expression of the indicated proteins and mCherry::H2B. (B) Cortical GFP::LGN levels were quantified by measuring fluorescence intensity using ImageJ (A). Shown is a representative experiment with minimum of n=30 cells measured for each condition. Four independent experiments were performed with similar results. *p < 0.05; ***p < 0.0001, one-way ANOVA and Dunn's comparison test. (C) HeLa GFP::LGN SAPCD2 knockout cells were engineered by CRISPR-Cas9 genome editing. A sgRNA targeting LacZ was used as a negative control. Images were acquired from the polyclonal pool of SAPCD2 knockout cells. (D) Western blot showing SAPCD2 is nearly absent in CRISPR-Cas9 engineered cells. (E) Quantification of (C). n = 75 cells were counted in each condition. ***p < 0.0001, Student's t-test. (F) SAPCD2 overexpression mitigates the effects of G α i overexpression on LGN cortical levels. To identify cells expressing both proteins, two bicistronic vectors were transfected: one enabling G α i expression and mCherry::H2B, and the other enabling myristoylated and palmitoylated (MP)::dsRed and the indicated proteins. See also **figure 36A**. (G) Quantification of (F). Three independent experiments were performed with similar results. ***p < 0.0001, one-way ANOVA and Dunn's comparison test. (H) SAPCD2 prevents apical localization of LGN. In prophase of wild-type RPCs, LGN localizes to the lateral membrane whereas it invades the apical domain in *Sapcd2* $-/-$ RPCs, at P0. Scale bar : 1 μ m. (I) Quantification of (H) in heterozygotes (grey) and *Sapcd2* $-/-$ (green) retinas.



LGN is apically enriched in *Sapcd2* *-/-* retinas (36.1%) compared to the heterozygotes (12.9%). Seven heterozygous mice (n=272 prophases) and eight *Sapcd2* *-/-* (n=274 prophases) were analyzed. Error bars in (B), (E), (G), and (I) represent SEM. **p = 0.001118; Student's t-test. See also **figure 36**.



Discussion

The G α i-LGN-NuMA ternary complex is an evolutionary conserved machinery linking aster microtubules to the cell cortex. Context-dependent localization of the ternary complex is needed to achieve appropriate orientation of cell division to contribute to epithelial cell morphogenesis or to adequately partition cell fate determinants during symmetric or asymmetric cell divisions. In this study, we identified the cell cycle regulated protein SAPCD2 as a novel regulator of the ternary complex and spindle orientation during the morphogenesis of epithelial cysts grown *in vitro* and asymmetric divisions of RPCs *in vivo*. We further report that SAPCD2 negatively regulates LGN anchoring to the cell cortex by competing with NuMA for LGN binding.

Although previous studies provided correlative evidence linking mitotic spindle orientation and unequal partitioning of fate determinants like NUMB with symmetric/asymmetric output in terminal divisions in the rodent retina (Cayouette 2003, Kechad *et al.* 2012), it remained unclear whether change in division orientation actually instructs fate decisions or is just a consequence of cells adopting different fates. A previous study showed that inactivation of *mInsc* in the rat retina reduces the proportion of vertically dividing RPCs and alters cell fates (Zigman *et al.* 2005), but whether this was caused by a change in the balance of symmetric and asymmetric divisions was not examined. In the current study, we used retroviral lineage tracing in the *Sapcd2* *-/-* mouse retina to show that alterations in division orientation leads to changes in symmetric/asymmetric terminal divisions, suggesting that orientation of the mitotic spindle directly influences cell fate decisions. Our finding that the proportion of oblique or vertical divisions at P0 largely matches that of asymmetric terminal divisions in both control and *Sapcd2* *-/-* retinas supports this interpretation, and suggests that the majority of asymmetric terminal divisions taking place around P0 in the mouse retina are generated through re-orientation of the mitotic spindle. It is important to note, however, that horizontal symmetric divisions are still observed in *Sapcd2* *-/-* retina suggesting that other pathways are involved and contribute to functional redundancy.



Interestingly, we did not detect any change in proliferation in *Sapcd2* *-/-* retinas, which is in contrast to the previously reported role of SAPCD2 as an oncogene (Xu *et al.* 2007, Sun *et al.* 2013, Yuan *et al.* 2013). These results indicate that SAPCD2 can exert different functions depending on context, and also reveals that, unlike in the developing forebrain where oblique/vertical divisions appear to drive proliferative divisions (Lancaster et Knoblich 2012), the retina does not use division orientation to regulate self-renewing asymmetric divisions. Indeed, if this were the case, a change in clone size would have been expected in lineage tracing studies on *Sapcd2* *-/-* retinas. Further work will be required to uncover the mechanisms driving self-renewing asymmetric divisions in the retina, as this will be essential to understand how the balance between proliferation and differentiation is achieved to produce a retina of the appropriate size and cellular composition. Although we observed about 3-times more terminal asymmetric cell divisions in *Sapcd2* *-/-* retinas, it did not lead to major changes in tissue organization (**figure 34**). This was somewhat predicted, however, since altering the identity of only the last pair of daughter cells in a lineage that can contain more than one hundred cells is not expected to have a major effect. Nonetheless, we did observe a small increase in the total number of bipolar cells in the *Sapcd2* *-/-* retinas (*Sapcd2* *+/-* : 62.2 ± 4.9 CHX10+ cells/300 μ m, n=4; *Sapcd2* *-/-* : 81.7 ± 1.4 CHX10+ cells/300 μ m, n=4; p=0.009 Student's t-test), as expected, but some of the bipolars in *Sapcd2* *-/-* did not localize in the appropriate layer (data not shown). Further work will be necessary to determine whether overproduction of bipolar cells from asymmetric terminal divisions in *Sapcd2* *-/-* leads to overcrowding in the bipolar cell layer and displacement of the extra cells, or to a distinct role for SAPCD2 in regulating post-mitotic neuronal migration. It will also be interesting to study how exactly SAPCD2 can function as an oncogene considering that defects in cell division orientation can contribute to disease and cancer development (Noatynska *et al.* 2012).

How does SAPCD2 precisely regulate spindle orientation? Our study uncovered that SAPCD2 interacts with several tight junction components such as ASPP2, PALS1, PATJ and PAR3, which likely control SAPCD2 localization at the apical domain of RPCs. NuMA binding to LGN has previously been shown to promote the “opening” of LGN and favour the binding of G α i-GDP to the GoLoco motifs located on the C-terminus of LGN (Du et Macara 2004). Our



results demonstrate that SAPCD2 competes with NuMA for binding to the TPR motifs of LGN, suggesting that SAPCD2 binding may reduce the affinity of LGN for G α i and thereby affect its cortical localization. Supporting these results, forced expression of SAPCD2 inhibited the cortical localization of LGN (**figure 30A**) and led to defective cystogenesis in MDCK 3D cultures (data not shown).

Our findings therefore suggest that in horizontally dividing cells, apical expression of SAPCD2 may guide localization of a functional G α i-LGN-NuMA complex on the basolateral membrane, and exclude LGN from the apical pole, thereby contributing to orient the mitotic spindle parallel to the apical membrane (**figure 31A**). Consistent with this model, we observed SAPCD2 expression at the apical pole in horizontally dividing RPCs through prophase and metaphase, where it could exclude the G α i-LGN-NuMA complex, thereby restricting it to the lateral poles. Our results showing that LGN invaded the apical domain in *Sapcd2* $-/-$ RPCs are consistent with this idea (**figure 30H**). Interestingly, SAPCD2 was no longer detected in anaphase RPCs, suggesting that spindle orientation is fixed when the cell enters anaphase, as was previously shown in cortical progenitors (Adams 1996). In vertically dividing RPCs, however, SAPCD2 was not detected at any stage of mitosis, suggesting that down-regulation of SAPCD2 is essential for RPCs to re-orient their spindle away from horizontal. How SAPCD2 is downregulated in vertically-dividing RPCs will require further investigation, but the absence of SAPCD2 is proposed to allow the G α i-LGN-NuMA complex to invade the apical cortex, thereby leading to re-orientation of the spindle along the apico-basal axis (**figure 31B**). Intriguingly, the protein mINSC, which also interacts with the TPR motifs of LGN, was previously shown to localize apically in RPCs and promote vertical divisions (Zigman *et al.* 2005), suggesting that it might act as a key adaptor for the ternary complex in the absence of SAPCD2. mINSC binding to LGN does not lead to its displacement from the cortex, however, suggesting that different LGN conformations are stabilized upon interaction with these proteins. The biochemical and functional interplay between SAPCD2 and mINSC to direct the localization of the G α i-LGN-NuMA ternary complex and to influence horizontal vs. vertical divisions will therefore need to be examined closely.



Since SAPCD2 acts as a negative regulator of the Gai-LGN-NuMA complex in RPCs, our model predicts that inactivation of LGN in this context should prevent re-orientation of the spindle along the apico-basal axis and increase horizontal divisions. This would be in contrast to the role of LGN in the developing mouse forebrain and chick neural tube, where it is required to maintain horizontal divisions (Morin *et al.* 2007, Konno *et al.* 2008), but similar to the role of LGN in the skin epithelium, where it is essential for re-orientation of the mitotic spindle along the apico-basal axis (Williams *et al.* 2014). Future experiments looking at LGN function in the retina *in vivo* should help resolve this issue.

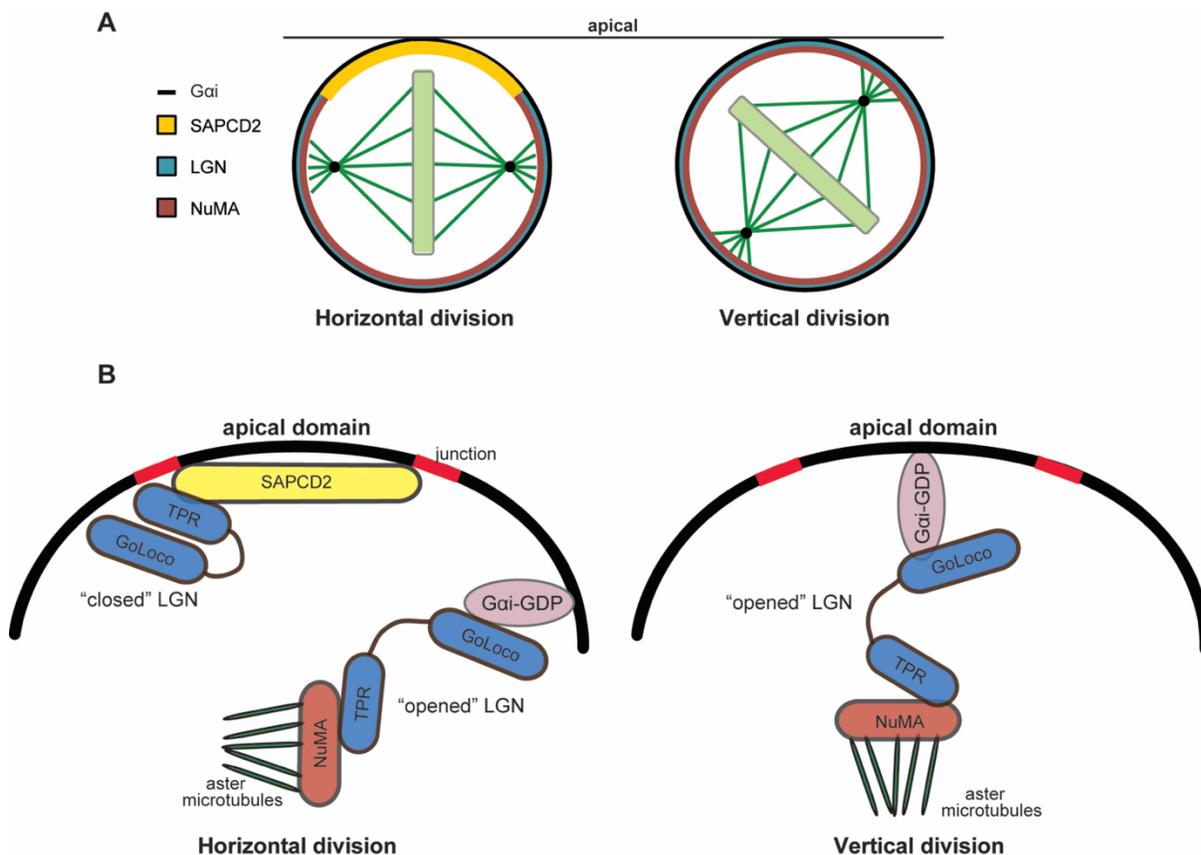


Figure 31. Proposed model for SAPCD2 function in spindle orientation.

(A) In the presence of SAPCD2 (left), LGN is displaced from the apical pole and cannot recruit NuMA to orient the mitotic spindle along the apico-basal axis. In this context, LGN and NuMA localize at the lateral poles and instruct horizontal divisions. In the absence of SAPCD2 (right), LGN can anchor around the entire cortex, such that mitotic spindle orientation is randomized. (B) Proposed molecular mechanism for SAPCD2. Left: SAPCD2 binds to the TPR motifs of LGN, thereby preventing interaction with NuMA and its anchoring to the apical cortex. LGN can interact with NuMA and Gai on the basolateral cortex where SAPCD2 is not expressed, leading to a horizontal division. Right: in the absence of



SAPCD2, the G α i-LGN-NuMA complex is free to invade the apical domain, leading to re-orientation of the spindle and vertical division.

In conclusion, our results uncover SAPCD2 as novel regulator of the mitotic spindle orientation pathway during epithelial morphogenesis and retinal progenitor cell division. Whether SAPCD2 is a context-dependent or pervasive regulator of the ternary complex and whether this function of SAPCD2 underlies its reported role in cancer awaits further investigation.

Experimental procedures

See also supplementary experimental procedures for more details.

Mass Spectrometry

HEK293T cells expressing SBP-HA-CBP-G α i-Q204L or FLAG-SAPCD2 were used for affinity purifications and subsequent mass spectrometry analysis as previously described (Angers *et al.* 2006, Liu *et al.* 2014). Briefly, lysate was centrifuged for 30 min at 40,000 x g and the soluble fraction subjected to dual affinity purifications (streptavidin and calmodulin beads) or immunoprecipitation using anti-FLAG M2 beads (Sigma). The beads were washed with TAP lysis buffer followed by ammonium bicarbonate, then eluted with 500mM ammonium hydroxide at pH 11.0. The eluate was dried and then resuspended in 50mM ammonium bicarbonate containing 25mM DTT and 100mMiodoacetamide before digesting with 1 μ g of sequencing-grade trypsin (Promega). The resulting peptide mixture was analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using an LTQ-XL linear ion trap mass spectrometer (Thermo Scientific). The acquired tandem mass spectra were searched against a FASTA file containing the human NCBI sequences using a normalized implementation of SEQUEST running on the Sorcerer platform. The resulting peptide identifications returned by SEQUEST were filtered and assembled into protein identifications using the Peptide and Protein Prophet suite (ISB, Seattle, WA). To identify specific SAPCD2-associated proteins, we subtracted a background list of contaminating proteins populated using



control FLAG immunoprecipitation (IP) from wild-type lysates and data sets from five irrelevant FLAG-tagged proteins.

Animals

All animal work was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. CD1, C57/BL6 (Charles River), and *Sapcd2* mutants (*Sapcd2* *-/-*) (Murata *et al.* 2004) of either sex were used in this study. Heterozygote littermates were used as controls in this study.

Retinal Explant Culture

E18.5 mouse (C57/BL6 and *Sapcd2* +/- and *Sapcd2* *-/-*) retinal explants were prepared and infected with retroviruses as previously described (Cayouette *et al.* 2001) with some modifications. Briefly, the neural retina was dissected away from the RPE in PBS. At E18.5, the retinas were cut into 3 pieces. The explants were infected with a retroviral vector encoding *Zoanthus* sp. green fluorescent protein (*ZsGreenpSiren*). Retroviral vectors were prepared in Phoenix packaging cell line and used to infect explants as described previously (Cayouette 2003). E18.5 retinal explants were cultured for 14 days in a CO₂ 5% incubator at 37°C, changing medium every 3 days.

Clonal analysis

After 14 days in culture, the explants were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature and processed for immunostaining as described above. Clones derived by each infected retinal progenitor cell were analyzed by counting the number of each cell type present in radial clusters, using morphology, position in the cell layers and using expression of cell-specific markers as CHX10 as a bipolar cell marker, according to standard procedures and as we previously described (Elliott *et al.* 2008, Kechad *et al.* 2012).

Mitotic Spindle Orientation

Mitotic spindle orientation was measured as previously described (Cayouette *et al.* 2001) using three-dimensional coordinate geometry. This method was modified according to Juschke *et al.*



(Juschke *et al.* 2014), who used a three-dimensional plane, instead of a line as the reference to determine spindle angles. Centrosomes were stained with anti- γ -TUBULIN antibody and DNA labeled with Hoechst. The orientation of the spindle axis was measured from the x, y, and z coordinates of the centrosome pairs relative to the plane of the neuroepithelium corresponding to the interface between the RPE and the neural retina, using a MATLAB program (The Mathworks). We analysed the centrosome pairs in cells in either metaphase or anaphase-telophase. Statistical comparisons were done using Student's t-test.

Acknowledgements

We wish to thank members of the Cayouette and Angers labs for discussions, Ian Hester and Jessica Barthe for mouse colony maintenance. This work was supported by The Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (grant #386323 to S.A.), the Canadian Institutes of Health Research (MOP-77570 to M.C.), and the W. Garfield Weston and Brain Canada Foundations. S.A. holds a Canada Research Chair in Functional Architecture of Signal Transduction and M.C. is a Senior Fellow of the Fonds de la recherche du Québec – Santé/Fondation Antoine Turmel.

Supplemental information

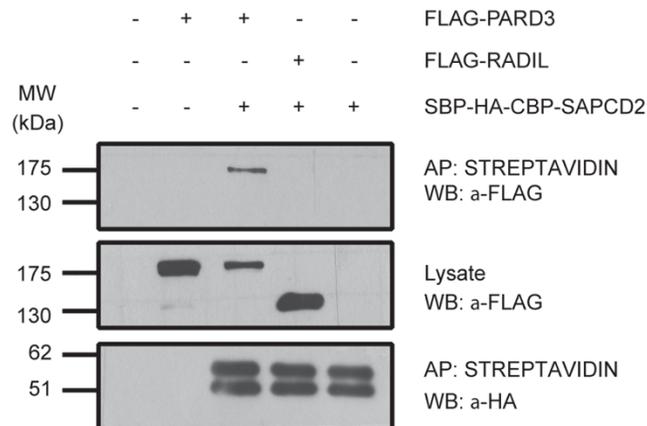


Figure 32. (figure S1) HA-SAPCD2 co-immunoprecipitates with FLAG-PARD3, related to figure 25.

HEK293T cells were transfected with expression plasmids coding for SBP-HA-CBP-SAPCD2 and FLAG-PARD3, or with the unrelated protein FLAG-RADIL as control. Cells were harvested 48hrs post-transfection and lysates were subjected to affinity purification with streptavidin resin. Bound proteins were resolved with SDS-PAGE and blotted with HA and FLAG antibodies.



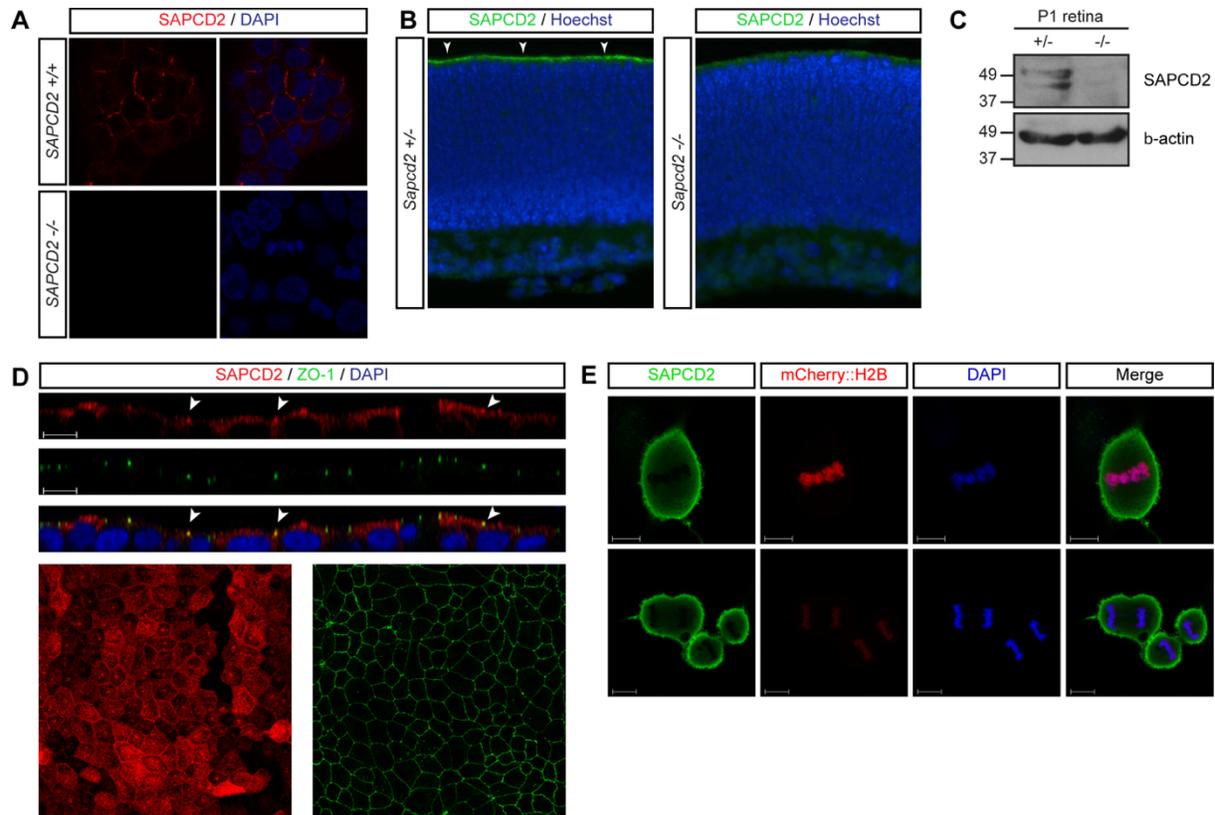


Figure 33. (figure S2) SAPCD2 antibody validation and ectopic SAPCD2 localization, related to figure 26.

(A) Immunostaining for SAPCD2 in HEK293T cells. Endogenous SAPCD2 is detected at the membrane of *SAPCD2* +/+ but not *SAPCD2* -/- cells generated by CRISPR-Cas9 genome editing. (B) Low magnification view of immunofluorescence staining for SAPCD2 on mouse retinal section at P0. In heterozygous retina, SAPCD2 is concentrated on the apical surface (arrowheads), whereas it is not detected in *Sapcd2* -/-. Both *Sapcd2* +/+ and *Sapcd2* -/- retinal sections were processed on the same slide and images were taken with the same exposure. (C) Western blot of lysates extracted from heterozygous (+/-) and *Sapcd2* -/- (-/-) P1 mouse retina using SAPCD2 antibodies. (D) SAPCD2 is found at the apical surface and co-localizes with ZO-1 in polarized MDCK cells overexpressing SAPCD2. Top three panels show an x-z axis cross-section of the MDCK monolayer. Bottom panels show the maximum intensity projection of SAPCD2 (red) and ZO-1 (green) staining of the MDCK monolayer. Scale bar : 10µm. (E) SAPCD2 is found at the cortex of dividing HeLa cells. Top panels show metaphase and bottom panels show anaphase and telophase cells. HeLa cells were transfected with the bicistronic vector expressing untagged SAPCD2 and an mCherry::H2B reporter to monitor cells receiving the plasmid (see also figure 36) then immunostained with SAPCD2 antibodies. Scale bar : 10µm.



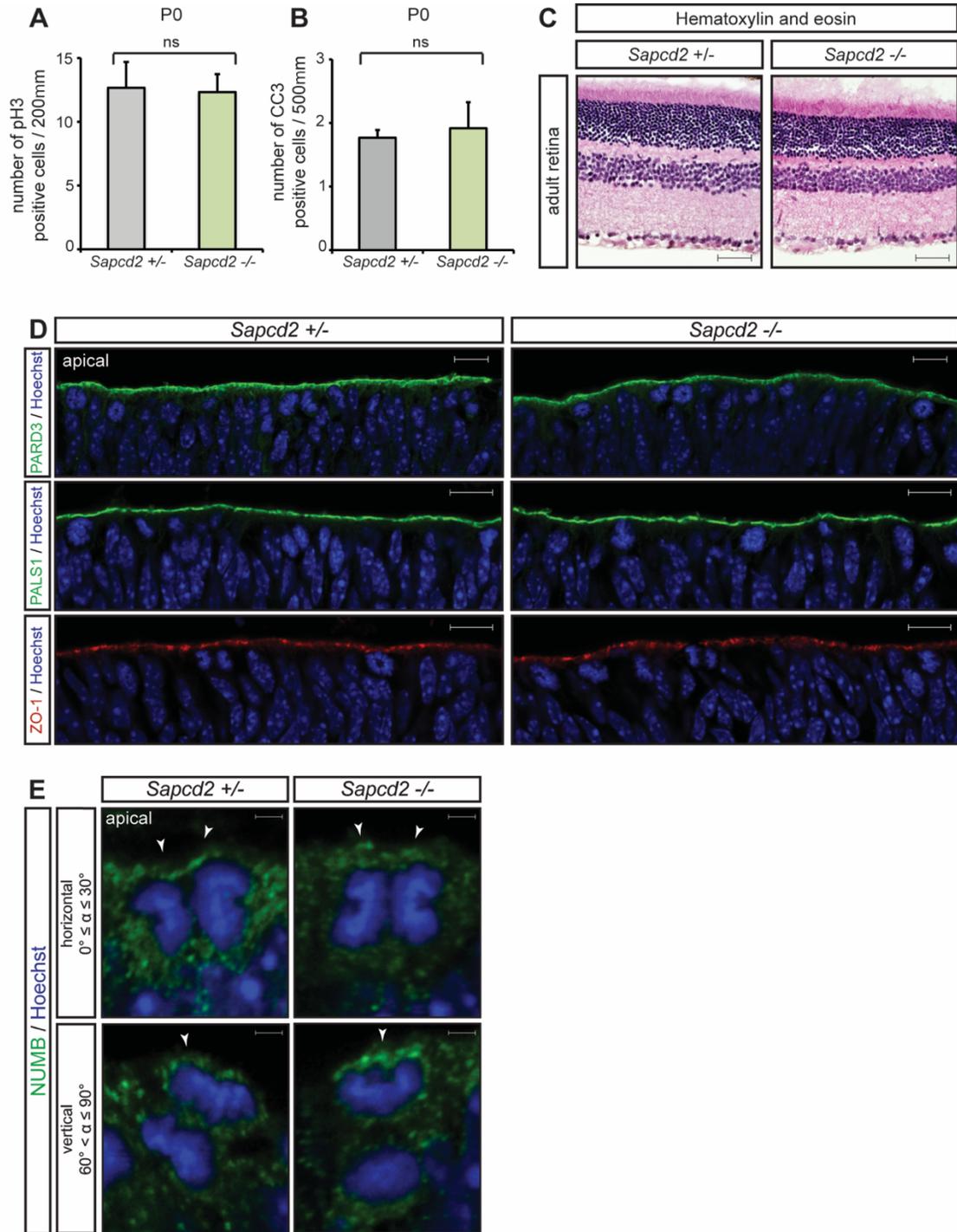


Figure 34. (figure S3) *Sapcd2* inactivation has no effect on proliferation, apoptosis, localization of key polarity players and NUMB inheritance *in vivo*, related to figure 29.
(A) Number of pH3 positive cells per 200 microns at P0 on retinal sections of heterozygous (grey) and *Sapcd2* -/- mice (green). There is no significant change (ns). Error bars show standard deviations between animals (n=3). **(B)** Number of cleaved caspase 3 (CC3) positive cells per 500 microns at P0 on retinal



sections of heterozygous (grey) and *Sapcd2*^{-/-} mice (green). There is no significant change (ns). Error bars show standard deviations between animals (n=3). **(C)** Adult retinal sections of heterozygous and *Sapcd2*^{-/-} mice stained with hematoxylin and eosin. Scale bar : 50 μm. **(D)** Confocal images of P0 mouse retinal section stained for PAR3 (green), PALS1 (green) and ZO-1 (red) in heterozygote and *Sapcd2*^{-/-} animals. Scale bar : 10 μm. Five heterozygotes and five *Sapcd2*^{-/-} were analyzed and no difference in staining pattern was detected. **(E)** Confocal images of horizontal and vertical divisions in the mouse retina at P0 in heterozygote and *Sapcd2*^{-/-}. Sections were stained for NUMB (green) and Hoechst to visualize DNA (blue), showing no change in NUMB localization between heterozygote and *Sapcd2*^{-/-} animals. Scale bar : 1 μm. Six heterozygotes and five *Sapcd2*^{-/-} were analyzed.

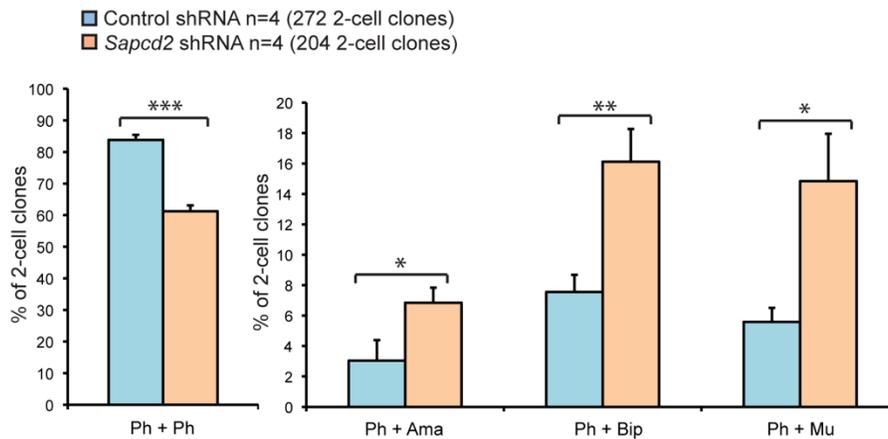


Figure 35. (figure S4) The shRNA-mediated knock-down of *Sapcd2* in RPCs increases asymmetric terminal divisions at the expense of symmetric terminal divisions, related to figure 29.

The graphs show 2-cell clone analysis of wild-type mouse retinal explants infected with a control retroviral vector (blue) or an shRNA retroviral vector targeting *Sapcd2* (orange) at P0 and cultured for 14 days. Ph, photoreceptor cells; Ama, amacrine cells; Bip, bipolar neurons; Mu, Muller glia. In all graphs, data represent the average of four animals. Error bars represent SEM. ***p ≤ 0.001; **p ≤ 0.01; *p ≤ 0.05; Student's t-test.



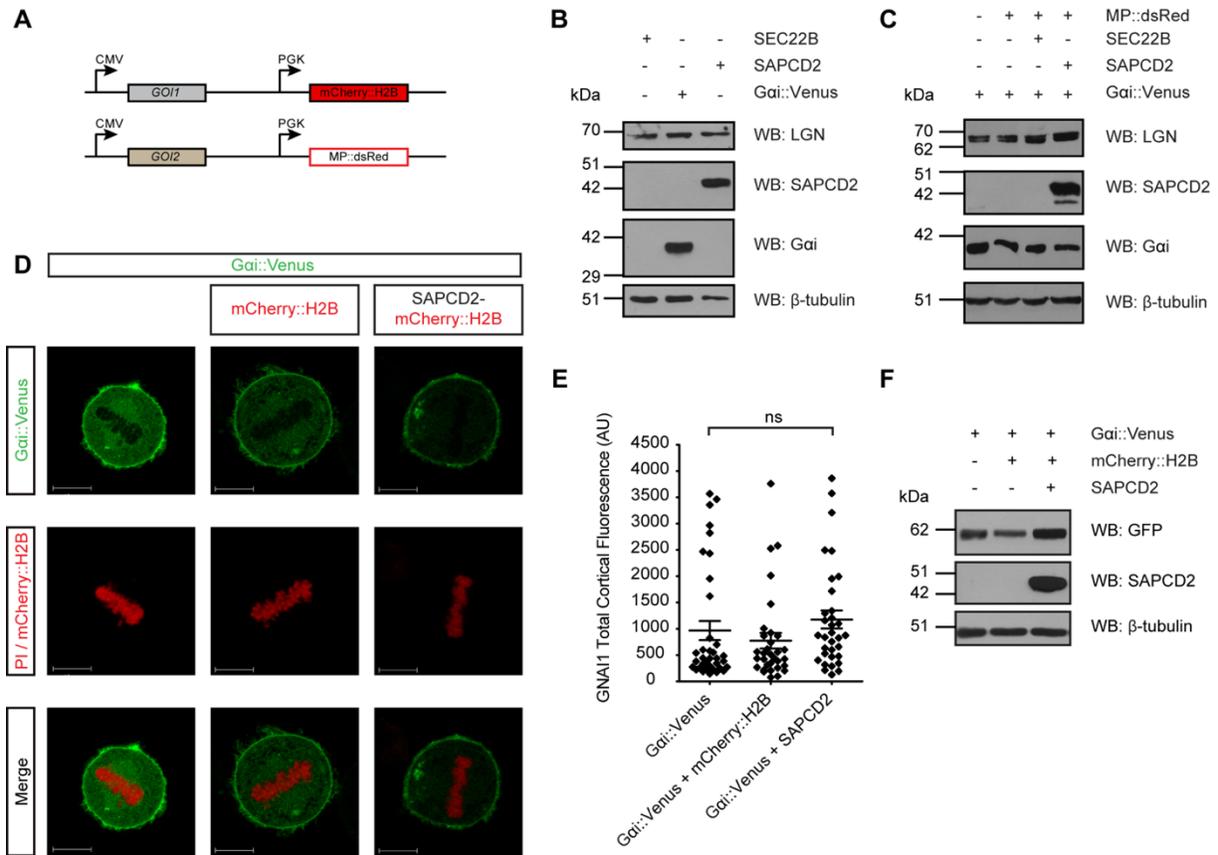


Figure 36. (figure S5) SAPCD2 overexpression does not change LGN expression levels nor Gai cortical localization, related to figure 30.

(A) Schematic representation of bicistronic vectors used to monitor cells receiving expression plasmids. For **figures 30A and 36D**, the top construct enabling mCherry::H2B expression was used to track cells receiving plasmids coding for the gene of interest (GOI). In **figure 30F**, Gai was cloned into the top construct and *SEC22B* or *SAPCD2* cloned into the bottom construct expressing MP::dsRed to identify co-transfected cells. (B) Western blot of lysates from cells overexpressing the indicated proteins used for the experiment in **figure 30A** shows that LGN protein expression remains unchanged. (C) Western blot of lysates from cells overexpressing the indicated proteins used for the experiment in **figure 30F** shows consistent Gai protein overexpression. (D) SAPCD2 overexpression does not affect Gai localization at the cortex. HeLa cells were transfected with plasmids coding for Gai::Venus alone or with another plasmid enabling expression of the indicated proteins. PI, propidium iodide. Scale bar : 10 μ m. (E) Quantification of total cortical Gai::Venus fluorescence intensity shown in (D). A minimum of n=30 cells was measured for each condition and three independent experiments were performed with similar results. One-way ANOVA and Dunn's comparison found no statistically significant difference. (F) Western blot of cell lysates from (D) showing expression of the desired proteins.



Tableau II. Supplementary table 1, related to figure 25 (annexe 1)

Table showing number of total and unique peptides as well as peptide coverage of proteins identified in GaiQ204L affinity purified pull-downs using mass spectrometry. Analysis of three independent experiments. Proteins identified in 2 out of 3 independent experiments are shown.

Tableau III. Supplementary table 2, related to figure 25 (annexe 2)

Table showing number of total and unique peptides as well as peptide coverage of proteins identified in SAPCD2 affinity purified pull-downs using mass spectrometry. Analysis of 9 independent experiments. Proteins identified in 4 out of 9 independent experiments are shown.

Supplementary experimental procedures

Cell Culture and Transfection

HEK293T and HeLa cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) and penicillin-streptomycin (Invitrogen) in a 37°C humidified incubator with 5% CO₂. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells were grown similarly but in MEM alpha (Invitrogen) supplemented with 5% FBS and penicillin-streptomycin. The HeLa GFP::LGN stable cell line was a gift from Iain Cheeseman (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge MA). Transient transfection of HEK293T cells was performed by calcium phosphate precipitation. Transient transfection of HeLa GFP::LGN cells was performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as per manufacturer's protocol at a 1:3 cDNA:Lipofectamine 2000 ratio. Bicistronic expression plasmids were constructed to encode for *SAPCD2*, *Gai* or *SEC22B* under a CMV promoter, and either mCherry::H2B or MP::dsRed under a PGK promoter to identify transfected cells using fluorescence. For cell cycle synchronization experiments, HeLa cells were synchronized by double thymidine block. Cells were grown to 60% confluence and 2mM thymidine was added to the media. After 17h, cells were rinsed with PBS and fresh media added to release the block for 8h, then re-treated with thymidine for 17h. To enrich for cells in mitosis, cells were treated for 12h with 100ng/mL nocodazole 8h after release from the second thymidine block.



SAPCD2 knockout cells were generated by transfecting HEK293T and HeLa GFP::LGN cells with the px459 plasmid containing the pSpCas9(BB)-2A-Puro and a guide RNA sequence targeting human SAPCD2. Cells were selected with puromycin for 48 hours, and single clones of HEK293T cells were isolated and expanded for immunofluorescence experiments. SAPCD2 knockout was confirmed by Western blotting and T7 endonuclease assay.

For 3D culture of MDCK cells, shRNA-infected cells were trypsinized, and re-suspended to 2×10^4 cells/mL containing 2% matrigel (BD Biosciences). 400mL of cells were seeded per each matrigel pre-coated well of an 8-well Lab well-Tek II chamber (Thermo Fisher Scientific). To measure lumen formation, cells were infected, plated 48 hours later, and cysts grown for 5d before processing for fixation and immunostaining. For measuring mitotic spindle angle, cells were incubated with shRNA viruses for 8 hours before plating on matrigel to allow cysts to form before full knockdown occurred, then grown for 3d before fixation and immunostaining.

Affinity purification and Western blotting

For affinity purification experiments, cells were lysed with TAP lysis buffer, centrifuged for 10 min at 21,000 x g, and the soluble fraction affinity purified with glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare) for 1 h at 4°C. Protein samples were separated by electrophoresis on a 10 % SDS-PAGE gels and then transferred onto PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA). The membranes were blocked with 5% milk in TBST (pH 8.0, 0.1% Triton). Immunoblotting with the primary antibody was performed at 4°C overnight in 0.5% dry milk in TBST. The primary antibody was detected with an HRP-conjugated goat anti-rabbit (1:10,000 Jackson Immunoresearch) in 0.5% dry milk in TBST. Detection of bound antibodies was visualized with the ECL kit (GE Life Science).

Antibodies and Reagents

Antibodies used for Western blotting were mouse anti- β -tubulin (E7, Developmental Studies Hybridoma Bank), mouse anti-cyclinB1 (554176, BD Biosciences), mouse anti-HA.11 (clone 16B12, Covance), rabbit anti-FLAG (F7425, Sigma), anti- β -actin (A5441, Sigma), mouse anti-GST (TAG004.100, BioShop), mouse anti-MBP (E8032S, NEB). For immunofluorescence,



antibodies used were mouse anti- α -tubulin (B-7, sc-5286, Santa Cruz), mouse anti-ZO-1 (33-9100, Invitrogen). Phalloidin conjugated to AlexaFluor 488, and secondary antibodies conjugated to AlexaFluor 488 and 594 were purchased from Life Technologies. Antibodies and conditions used for immunohistochemistry are detailed in supplementary methods **table IV**.

Tableau IV. Antibodies used in this study

Antibody	Source	Dilution	Fixation
SAPCD2 (rabbit)	home-made from N-ter GST fusion	1/200	15 minutes PFA 4% (RT)
NuMA (rabbit)	abcam	1/200	30 minutes PFA 4% (RT)
GPSM2/LGN (rabbit)	sigma	1/200	TCA 10% 10 minutes (on ice)
γ -TUBULIN (goat)	santa Cruz biotechnology	1/200	4h30 PFA 4% (4°C)
CHX10 (sheep)	exalpha	1/500	1h PFA 4% (4°C)
pH3 (rabbit)	millipore	1/400	3h to 4h30 PFA 4% (4°C)
NUMB (rabbit)	abcam	1/200	15 minutes PFA 4% (RT)
ZO-1 (rat)	DSHB	1/200	15 minutes PFA 4% (RT)
PAR3 (rabbit)	upstate biotechnology	1/200	15 minutes PFA 4% (RT)
PALS1 (rabbit)	santa Cruz biotechnology	1/200	15 minutes PFA 4% (RT)
CC3 (rabbit)	NEB	1/200	3h to 4h30 PFA 4% (4°C)

SAPCD2 rabbit polyclonal antibodies were raised against the N-terminal (1-111) region of a recombinant, GST-tagged human SAPCD2 protein (Cocalico Biologicals). The fusion protein was expressed in BL-21 Escherichia coli by stimulating with 500mM IPTG (Sigma), 37°C for 4h. The bacteria pellet was harvested and lysed by sonication in buffer containing 20mM Tris-HCL pH 8.0, 150mM NaCl, 5mM DTT, 1mM PMSF. Proteins were purified by affinity chromatography using Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) and eluted. Antibodies were affinity purified from serum first using negative selection against GST proteins then through a similar column with immobilized GST-N-terminal-SAPCD2 proteins. Purified antibodies were validated by Western blotting lysates from *Sapcd2* $+/+$ and *Sapcd2* $-/-$ mouse tissue and HEK293T cell lysates.



Fusion Protein Production and Binding Assay

GST and MBP fusion proteins were produced using the pGEX-4T1 and pMAL-C2 plasmids respectively. The His-S-tagged NuMA(1818–2001) construct was a gift from Dr Ian Macara. Plasmids were transformed into BL21 cells and expression was induced with isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) as follows: GST-SAPCD2: 0.5mM, 37°C, 3h; GST-Gαi: 2mM, room temperature, 16h; GST-LGN: 5μM, room temperature, 16h; GST: 0.4mM, 37°C, 3h; MBP: 0.4mM, 37°C, 3h; MBP-LGN(1-358): 0.4mM, room temperature, 16h; MBP-LGN(483-684): 0.4mM, 37°C, 3h; His-S-NuMA(1818-2001): 0.4mM, 37°C, 3h. Bacterial cell pellets were lysed *via* incubation in 50mM HEPES pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM MgCl₂, 10mg/10mL sodium deoxycholate, 10mM β-mercaptoethanol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), supplemented with Sigma protease inhibitor cocktail, and sonication. Crude lysates were cleared *via* centrifugation at 20,000 x g for 30 mins at 4°C and incubated with glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare), amylose (New England Biolabs), or Hislink (Promega) resin according to the manufacturer's protocols. Bound proteins were washed extensively, and His-S-NuMA(1818-2001) was eluted with 0.5M imidazole, while MBP-tagged proteins were eluted with 50mM maltose. Purity of fusion proteins was assessed *via* SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining (BioBasic). Recombinant GST and GST-SAPCD2 were affinity purified using the GST-Trap_M magnetic resin (stm-100, ChromoTek GmbH) then washed with lysis buffer containing 500mM NaCl. Resin was re-equilibrated with binding buffer (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% NP-40, 10% glycerol) before incubation with purified MBP-LGN(1-358) or MBP-LGN(483-684).

HEK293T cells expressing pGLUE-SAPCD2 were harvested and lysed in TAP lysis buffer for 30 minutes on ice followed by centrifugation at 15,000 x g for 30 minutes to pellet insoluble material. Cleared cell lysate was incubated with immobilized fusion protein resins for 1.5h at 4°C with end-over-end rotation in the presence or absence of soluble His-S-NuMA(1818-2001) as indicated. Resins were washed extensively with TAP lysis buffer and bound proteins eluted by incubation in Laemmli sample buffer at 95°C for 5 minutes. Following SDS-PAGE membranes were transferred to PVDF membranes (Millipore), stained with Ponceau S



(Bioshop) to ensure equal loading of immobilized fusion proteins and destained with 0.1M NaOH and ddH₂O washing.

Histology, Immunofluorescence and Image acquisition

Eyes were enucleated in PBS and fixed by immersion in freshly prepared 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS or trichloroacetic-acid (TCA) for different times depending on the primary antibody used (**tableau III, annexe 2 (table S2)**), cryoprotected overnight at 4°C in sucrose 20%, embedded in 20% sucrose:OCT (1:1), and stored at -80°C. Eyes were cryosectioned at 12µm and retinal explants at 25µm, and processed for staining on the same day. Slides were pre-incubated for 1h in blocking buffer (1% BSA, 0.1% to 0.3% Triton) and then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in blocking buffer (**tableau III, annexe 2 (table S2)**). Primary antibodies were detected using appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa 488, 555 or 594 (1:1000; Invitrogen) diluted in PBS at room temperature for 1h. In all cases, nuclei were stained with Hoechst (1:20,000 Molecular Probes). The slides were mounted in Mowiol.

HeLa GFP::LGN cells were fixed 48 hrs post-transfection in 4% paraformaldehyde for 5 min then mounted on slides for imaging using Vectashield containing DAPI (Vector Labs). For SAPCD2 immunocytochemistry, cells were fixed in 4% paraformaldehyde pH 7.4 for 5 minutes at room temperature. Cells were sequentially incubated with 3 blocking solutions: 10% NDS in 0.5% Triton, 0.1 mg/mL avidin in TBS-T, 0.5 mg/ml biotin in TBS-T, each for 1h at room temperature. Primary antibody was used at 1:100, followed by biotin-conjugated rabbit (1:500; Bethyl Labs), and Streptavidin Alexa Fluor 594 (1:500; Invitrogen) secondary antibodies. Slides were mounted as above. Images were acquired using a Plan-Apochromat 40x/1.4 NA oil immersion objective on a laser scanning confocal microscope (LSM700; Carl Zeiss) operated by Zen 2011 software.

Retinal electroporation

DNA preparation was diluted in water containing 0.5% Fast Green and injected subretinally at P0. After the injection, tweezer-type electrodes (Gene paddles, 3 x 5 mm Paddles Model 542,



Harvard Apparatus), soaked in PBS were placed on either side of the eye and five square pulses of 50-ms at 50 V were applied using a pulse generator (ECM 830 Square Wave Electroporation System, Harvard Apparatus). Electroporated retinas were dissected immediately and cultured as explants for 24h, fixed and processed for immunostaining as described above.

Genotyping

Animals were genotyped from tail genomic DNA obtained by PCR using a mixture of three primers. Oligos used for genotyping were: p5 (5'-GAATGGAAGGATTGGAGCTACGG-3') (Murata *et al.* 2004), F1 (5'-TGC GGA GCC AAT CCC GGA ACA GAT-3') and R2 (5'-CTG TGG GTC TCC AGT TTC TAG CA-3'). F1/R2 primers amplify an 828 bp product, corresponding to the wild type allele and the p5/R2 primers amplify a 584 bp product from the mutant allele. PCR conditions were 94°C for 4min ; 28 cycles (denaturation, 30s at 95°C; annealing, 45s at 63°C; extension, 30s at 72°C); 72°C for 10min.

Mitotic Cells Count

The number of pH3 positive cells was quantified by averaging the number of positive cells from 3 to 9 hemi-retina at the level of the optic nerve for each animal, and expressed as number of positive cells per unit length of retina. Statistical comparisons were done using Student's t-test.

β -galactosidase staining

Retinal sections were pre-incubated for 1h in blocking buffer and then incubated in the X-gal solution (MgCl₂ 1M, NP-40 2%, sodium deoxycholate 2% in PBS pH 7.2, plus Potassium hexacyanoferrate II and III and X-gal) at 37°C until desired level of staining was achieved.

Measurement of Cortical Fluorescence Intensity

To measure cortical LGN and G*o*i::Venus fluorescence, raw Carl Zeiss image files were opened in ImageJ, the entire cortex area was selected as region of interest (ROI) and intensity values measured and corrected for background. Quantification was performed on raw, unmodified image data. Statistical analysis was carried out with one-way ANOVA and Bonferroni post hoc test.



CHAPITRE 3

RÉSULTATS



Chapitre 3 : Résultats et discussion

Contributions des auteurs

Figure 37A et C : Carine Monat

Figure 37B, D et E : Marine Lacomme

Figure 38A : Marine Lacomme

Figure 38B à M : Carine Monat

Figure 39 : Carine Monat

Figure 40A, B, E à L : Marine Lacomme

Figure 40C et D : Carine Monat

Figure 41A à D, F à H : Marine Lacomme

Figure 41E : Carine Monat

Figure 42 : Carine Monat

Figure 43 : Christine Jolicoeur

Figure 44 : Carine Monat

Figure 45 : Carine Monat

Carine Monat, Marine Lacomme et Michel Cayouette ont planifié les expériences

Carine Monat, Marine Lacomme et Christine Jolicoeur ont réalisé les expériences

Carine Monat, Marine Lacomme, Christine Jolicoeur et Michel Cayouette ont analysé les résultats

Michel Cayouette supervise et fournit les ressources



SAPCD2 ET LGN RÉGULENT L'ORIENTATION DU FUSEAU MITOTIQUE AU COURS DE LA PHASE PROLIFÉRATIVE DE LA RÉTINOGENÈSE

Méthodes expérimentales

Animaux

Tous les animaux utilisés dans cette thèse sont autorisés et utilisés en fonction des recommandations du conseil Canadien de protection des animaux en science. Des lignées de souris CD1, C57/BL6 (Charles River), *Sapcd2* *-/-*, *Lgn* *-/-* (Lacomme *et al.* 2016), et *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* et *Lgn flox* (Tarchini *et al.* 2013), sans distinction du sexe ont été utilisées. Dans cette recherche, les animaux hétérozygotes ont été utilisés comme contrôles.

Immunofluorescence

Les anticorps utilisés pour les immunofluorescences sont les mêmes qu'utilisés dans le chapitre précédent et les suivant : lapin anti-GFP (1:1000 Life Technology cat# A11122, lot#1691382), souris anti-BrdU (1:400 Dako cat# M074401-8, clone BU20A, lot# 20006290), lapin anti-PAX6 (1:400 Chemicon Millipore AB2237, lot# 2455611), chèvre anti-ninein (1:100, Santa Cruz cat# SC-50142), lapin anti-pericentrin (1:200, Covance cat# PRB-432C), chèvre anti-BRN3B (1:200, Santa Cruz SC-6026), souris anti-glutamine synthetase (1:200, BD), souris anti-TUJ1 (1:1000, Cedarlane (Covance) Cat# MMS-435P), lapin anti-recoverin (1:200, Berkeley Ab Co.), souris anti-rhodopsin (1:200, Creative diagnostics cat#DMAB9137MD), souris anti-aPKC (1:200, Santa Cruz cat#SC-8393). Les anticorps secondaires sont conjugués avec AlexaFluor 488 ou 594 (Life Technologies).

À E11.5, E14.5 les têtes des embryons sont fixées, à P0 les yeux seulement sont fixés, par immersion dans une préparation de 4% paraformaldehyde (PFA) ou de 10% trichloroacétique-acide (TCA), à différents temps selon les anticorps (**tableau V**). Aux stades adultes, les animaux sont perfusés avec de la PFA 4%. Puis les yeux sont cryoprotégés dans du sucrose 20% pour une nuit à 4°C, inclus dans des blocs de 20% sucrose:OCT (1:1) et conservés à -80°C. Les sections, les immunofluorescences et l'acquisition d'images ont été réalisées comme décrit précédemment (chapitre précédent, (Chiu *et al.* 2016, Lacomme *et al.* 2016)).



Tableau V. Anticorps utilisés dans ce chapitre, et la fixation du tissu correspondante

Anticorps	Fixation
SAPCD2 (lapin)	tête, 15min PFA 4%
LGN/GPSM2 (lapin)	tête, 10min TCA 10% (sur glace)
γ -TUBULIN (mouton)	4h30 PFA 4% (4°C)
NINEIN (chèvre)	tête, 10min TCA 10% (sur glace) or 1h PFA 4%
PERICENTRIN (mouton)	tête, 1h PFA 4% (4°C)
PAX6 (lapin)	30min PFA 4% (4°C) explant ; perfusion adulte PFA 4%
BRN3B (chèvre)	perfusion adulte PFA 4%
CHX10 (mouton)	30min PFA 4% (4°C) explant ; perfusion adulte PFA 4%
GS (souris)	perfusion adulte PFA 4%
aPKC (souris)	perfusion adulte PFA 4%
TUJ1 (souris)	perfusion adulte PFA 4%
RHODOPSIN (souris)	3h PFA 4% (4°C)
BrdU (souris)	tête, 3h PFA 4% (4°C)
pH3 (lapin)	tête, 3h PFA 4% (4°C)

Génotypage

Les animaux ont été génotypés à partir d'un extrait d'ADN de leur queue. Les amorces utilisées pour le génotypage de SAPC2 sont celles décrites précédemment (chapitre précédent, (Chiu *et al.* 2016)). Ceux pour *Lgn* et *Lgn flox* sont : 5'ex5 F CAAGGTAATAAAGATGGCGGGC ; 3'ex5 R GCAGGGCAGTTGTGAAATGG ; neo F TCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACG. Les conditions PCR sont : 94°C pendant 4min ; 35 cycles (dénaturation 30s à 94°C ; *annealing* 45s à 58°C ; extension 30s à 72°C) ; 72°C pendant 10min.

Orienteur du fuseau mitotique

L'angle du fuseau mitotique des progéniteurs en division a été mesuré avec le même protocole qu'utilisé précédemment (chapitre précédent, (Chiu *et al.* 2016, Lacomme *et al.* 2016)). Les centrosomes sont marqués avec les anticorps primaires anti-ninein et anti-pericentrin, l'ADN avec *Hoechst*, sur des sections de cerveau d'embryon à E14.5. À E11.5 et P0, les résultats sont préliminaires, parce que les angles sont mesurés en 2D. Considérant que la différence des mesures en 3D et 2D est inférieure à 1% et que le phénotype est sévère, nous nous attendons à des résultats similaires entre une analyse en 2D et en 3D. L'analyse des angles a été réalisée dans des progéniteurs en métaphase, anaphase et télophase. L'analyse



statistique est basée sur le test de Student. Les divisions cellulaires sont classées comme décrit en introduction : horizontales avec des angles de 0° à 30°, obliques de 30° à 60° et verticales de 60° à 90°. Dans la **figure 39**, les divisions cellulaires obliques et verticales sont additionnées, sous le nom de divisions verticales de 30° à 90°.

Injection de BrdU

L'incorporation de BrdU *in vivo* est réalisée par une injection péritonéale de BrdU (100mg de BrdU/kg) dans des souris gestantes *Lgn* +/- et *Lgn* -/- et *Lgn* +/-; *Sapcd2* +/- et *Lgn* -/-; *Sapcd2* -/- à E14.5 et E16.5. Les embryons sont euthanasiés une heure après l'injection. Les cerveaux des embryons sont fixés 3 heures dans de la PFA 4%, cryoprotégés une nuit dans du sucrose 20%, mis en bloc sucrose:OCT (1:1), et coupés au cryostat à 12µm. Les sections sont traitées 30 minutes avec du 2N HCL à 37°C avant l'incubation de l'anticorps primaire anti-BrdU.

Surexpression de Numb

Les explants rétiniens sont préparés, infectés et analysés comme précédemment (chapitre précédent, (Cayouette *et al.* 2001, Chiu *et al.* 2016)) à partir de souris sauvages à E13.5. Les explants sont infectés avec un rétrovirus GFP ou avec le vecteur Numb-IRES-GFP, surexprimant *Numb*.

Photoconversion

Les explants rétiniens sont préparés et infectés comme précédemment (chapitre précédent, (Cayouette *et al.* 2001, Chiu *et al.* 2016)) à partir de souris *Lgn* +/-; *Sapcd2* +/- et *Lgn* -/-; *Sapcd2* -/-, à E13.5, à raison de trois explants par membrane. Les explants sont infectés avec un rétrovirus qui exprime un vecteur photoconvertible dérivé de la GFP, CAGGS-KikGR. Ils sont cultivés dans une chambre à 37°C avec 5% de CO₂, attenante au microscope confocal *spinning-disk*, et filmés en quatre dimensions, selon un protocole adapté de celui décrit dans l'article (Cayouette 2003), avec un temps d'acquisition total de 30 heures, 30 minutes entre chaque, et 23 points d'acquisition dans la largeur de l'explant par cellule ciblée. La photoconversion se fait au confocal avec deux courtes expositions au laser 405, de 200 millisecondes chacune, à raison d'une ou deux cellules par explant. Puis les explants sont filmés de nouveau avec les paramètres précédents pendant 72 heures, avant d'être fixés pour analyser les clones, en comptant les cellules rouges et les cellules vertes qui les composent. Ce protocole a été réalisé avec l'aide de Dominic Filion, responsable de la plateforme microscopie à l'IRCM.



Résultats et discussion

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit le rôle de *Sapcd2*, comme nouveau régulateur de l'orientation planaire des divisions cellulaires aux stades tardifs de la rétino-genèse. Ces divisions produisent deux photorécepteurs. En son absence, le nombre de divisions verticales augmente, augmentant ainsi le nombre de divisions terminales asymétriques, produisant un photorécepteur plus un autre type de neurone. SAPCD2 régule négativement LGN lors de la mitose, qu'il exclut de la membrane apicale, le contraignant au cortex cellulaire latéral, engendrant ainsi une division horizontale terminale symétrique.

LGN, connu pour sa fonction de régulateur clef de l'orientation du fuseau mitotique dans plusieurs contextes, est exprimée dans la rétine en développement (Raji *et al.* 2008). Nous avons publié une étude en parallèle de celle de SAPCD2, sur le rôle de LGN dans l'orientation de la division des progéniteurs aux stades tardifs du développement rétinien, dont les résultats corroborent ceux sur le rôle de SAPCD2 dans la rétine (Lacomme *et al.* 2016). L'article publié est en annexe 3. LGN régule l'orientation verticale des divisions cellulaires aux stades tardifs de la rétino-genèse. Ces divisions sont asymétriques et produisent deux neurones différents. À l'inverse de la perte de *Sapcd2*, en absence de *Lgn*, le nombre de divisions horizontales augmente (**figure 37B**). Des explants de rétines de souris *Lgn +/-* et *Lgn -/-* ont été infectés à P0 avec un vecteur GFP et fixés 14 jours après (**figure 37C**). L'analyse de la composition des clones deux cellules, soit les divisions terminales de ces explants, montre qu'en l'absence de *Lgn*, le nombre de divisions symétriques produisant deux photorécepteurs augmente par rapport aux souris contrôles (**figure 37D**). Ces résultats suggèrent que les divisions cellulaires sont par défaut horizontales au stade de développement tardif. L'analyse du nombre de cellules par clones, qui reflète la prolifération rétinienne, ne montre pas de différence entre les souris *Lgn +/-* et *Lgn -/-* (**figure 37E**). Ce résultat démontre que *Lgn* n'est pas nécessaire dans la régulation de la prolifération rétinienne à ces stades.



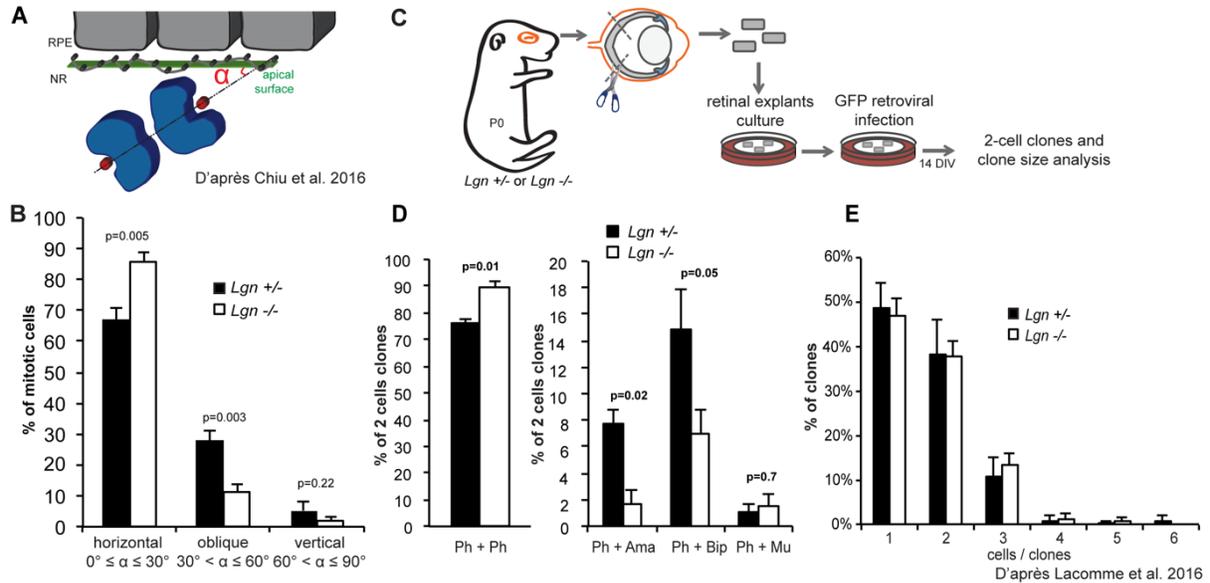


Figure 37. LGN est requis pour les divisions verticales et les divisions cellulaires asymétriques terminales à P0 dans la rétine.

(A) Schéma illustrant la méthode de mesure de l'angle du fuseau mitotique des progéniteurs rétiniens en division à P0. Mesure réalisée en 3 dimensions en utilisant les coordonnées des centrosomes (rouges) marqués avec γ Tubulin, et celles de la membrane apicale (verte). NR: rétine neurale, RPE: épithélium pigmentaire rétinien. L'angle α est ensuite mesuré avec un programme informatique, basé sur des formules trigonométriques en 3D. Publié dans (Chiu *et al.* 2016). (B) Quantification de la distribution des angles de divisions des progéniteurs rétiniens à P0 en anaphase/télophase, dans des souris *Lgn* +/- (n=4, 256 div) en noir et *Lgn* -/- (n=6, 358 div) en blanc. Les divisions cellulaires sont horizontales avec des angles de 0° à 30°, obliques de 30° à 60° et verticales de 60° à 90°. La barre d'erreur représente la SEM, la *p* value indique le *t*-test de Student. Publié dans (Lacomme *et al.* 2016). (C) Schéma illustrant le protocole pour l'analyse clonale. Les explants sont infectés à P0 avec un rétrovirus GFP, avant d'être fixés pour analyser les clones composés de deux cellules (D) et la taille des clones (E). Modifié de (Chiu *et al.* 2016). (D) Composition des clones deux-cellules 14 jours après l'infection dans des souris *Lgn* +/- (n=4, 172 clones 2 cellules) en noir et *Lgn* -/- (n=5, 219 clones 2 cellules) en blanc. La barre d'erreur représente la SEM, la *p* value indique le *t*-test de Student. Ph: photorécepteur, Ama: amacrine, Bip: bipolaire, Mu: Müller. Publié dans (Lacomme *et al.* 2016). (E) Moyenne du nombre de cellules par clone, 14 jours après l'infection dans des souris *Lgn* +/- (n=4) en noir et *Lgn* -/- (n=5) en blanc. La barre d'erreur représente la SEM. Publié dans (Lacomme *et al.* 2016).

Nous avons montré qu'aux stades tardifs de la rétino-genèse, *Sapcd2* est requis pour les divisions horizontales, tandis que *Lgn* assure les divisions verticales. Quels sont leurs rôles dans les stades plus précoces du développement, aux stades prolifératifs ? Est-ce que l'orientation du fuseau mitotique joue un rôle dans le devenir des cellules filles des divisions prolifératives ?



Dans la rétine, la majorité des divisions verticales est observée aux stades tardifs du développement, lors desquels elles contrôlent les divisions cellulaires terminales asymétriques (**figure 21**) (Cayouette *et al.* 2001, Cayouette et Raff 2002, Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005, Kechad *et al.* 2012). Aux stades embryonnaires précoces, lors des phases prolifératives, les divisions verticales sont rares, moins de 5% (Cayouette *et al.* 2001). Leur faible nombre rend difficile l'étude de leur rôle dans le devenir des cellules filles.

Dans ce chapitre, nous exploitons nos récentes découvertes sur *Sapcd2* et *Lgn* pour réorienter le fuseau mitotique et étudier le rôle de l'orientation des divisions verticales aux stades prolifératifs de la rétino-genèse.

Expression spatio-temporelle de SAPCD2 et LGN dans les progéniteurs rétiniens

Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'expression de SAPCD2 et LGN aux stades embryonnaires précoces. À P0, nous avons montré précédemment que SAPCD2 et LGN ont une expression mutuellement exclusive dans les progéniteurs rétiniens en division qui s'apprêtent à se diviser à l'horizontale (**figure 26F et N**). SAPCD2 est exprimée à la membrane apicale (**figure 26F**), tandis que LGN est restreint au cortex cellulaire latéral (**figure 26M à O**).

Nous avons également montré qu'ils sont tous deux exprimés pendant les phases prolifératives de la rétino-genèse (**figure 26B-C ; figure 38A**). Par une révélation de l'activité β -Galactosidase, nous voyons *Sapcd2* exprimé à E14.5 (**figure 26C**), confirmé par western-blot où SAPCD2 est également détectée à E17.5 (**figure 26B**). Par hybridation *in situ*, *Lgn* est détecté dans la couche des progéniteurs rétiniens à E14.5, E16.5 et P0 (**figure 38A**). Cependant, leur localisation cellulaire en mitose reste inconnue aux stades embryonnaires. Pour les étudier, nous utilisons les mêmes anticorps que ceux utilisés et validés précédemment (Chiu *et al.* 2016, Lacomme *et al.* 2016).

Comme à P0, SAPCD2 (**figure 38B**) et LGN (**figure 38C**) sont localisées à la surface apicale de la rétine à E14.5.

En prophase, la localisation de SAPCD2 varie. Elle est exprimée tout autour de la cellule (**figure 38D**) ou au cortex baso-latéral (**figure 38D'**). Une quantification de la proportion de chacune des localisations sera nécessaire. Au cortex baso-latéral, SAPCD2 semble colocaliser



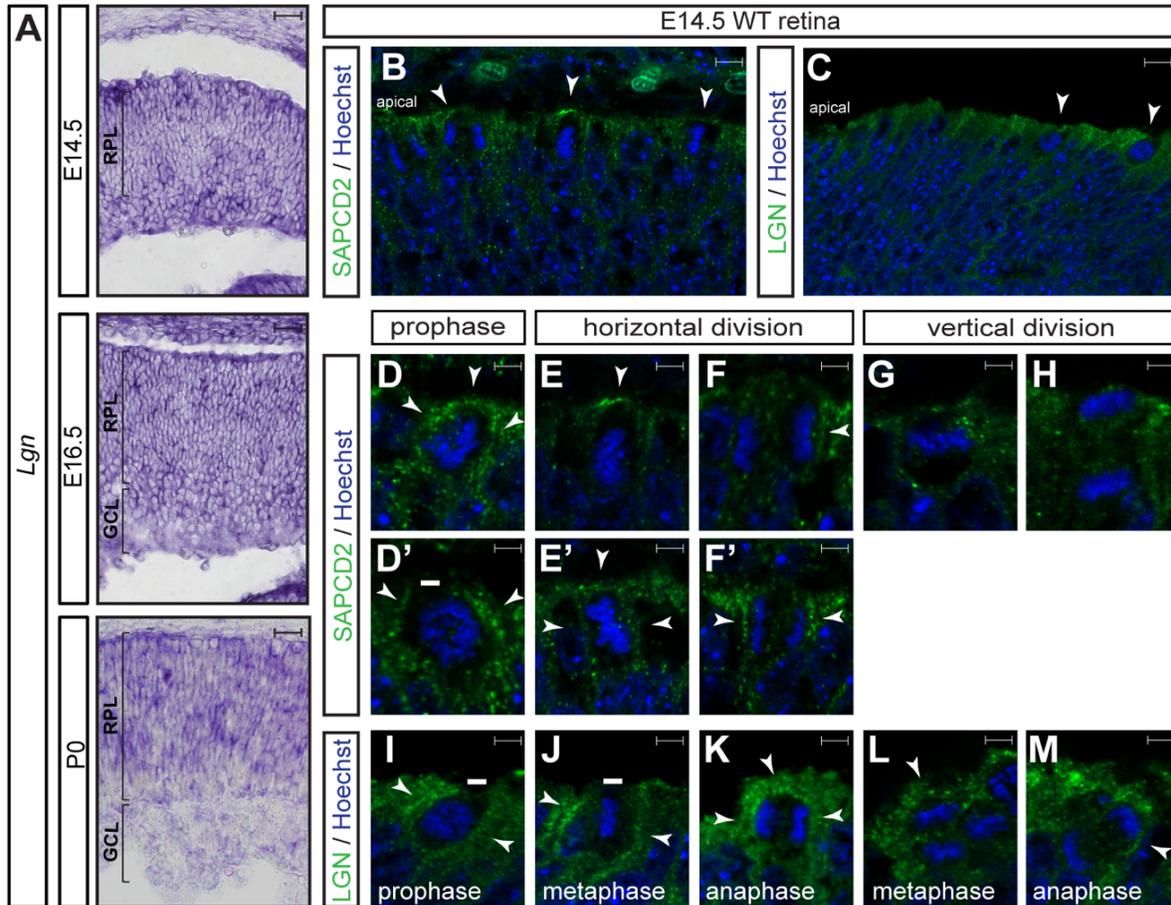
avec LGN (**figure 38I**). Nous ne pouvons pas réaliser de co-marquage parce que les anticorps disponibles sont produits dans la même espèce. Mais nous observons qu'à E14.5, SAPCD2 et LGN ont la même localisation au cortex cellulaire latéral en prophase (**figure 38D' et I**).

Dans les progéniteurs se divisant à l'horizontale, la localisation de SAPCD2 varie en métaphase, elle est parfois concentrée sous forme de croissant apical (**figure 38E**) ou tout autour du cortex cellulaire (**figure 38E'**), une quantification sera nécessaire. En anaphase/télophase, SAPCD2 est observée aux pôles du fuseau mitotique (**figure 38F**), ainsi qu'asymétriquement dans un des deux centrosomes (**figure 38F'**). Une colocalisation avec une protéine spécifiquement exprimée aux centrosomes sera nécessaire, comme ninein ou pericentrin. LGN est aussi exprimée aux pôles du fuseau mitotique dans les divisions horizontales (**figure 38J-K**), ainsi qu'à la membrane apicale en anaphase/télophase (**figure 38K**). SAPCD2 et LGN ont la même localisation au cortex cellulaire latéral des progéniteurs se divisant à l'horizontale (**figure 38E', F, F', J, K**).

Dans les progéniteurs se divisant à la verticale, SAPCD2 n'est pas détectée (**figure 38G-H**), tandis que LGN semble être exprimée tout autour de la métaphase (**figure 38L**), et aux pôles du fuseau mitotique en anaphase/télophase (**figure 38M**).

À P0, SAPCD2 et LGN ont une localisation corticale complémentaire, tandis qu'à E14.5, elles sont conjointement exprimées aux pôles du fuseau mitotique des progéniteurs en division. Nous faisons l'hypothèse que leur fonction puisse être redondante aux temps précoces de la rétino-genèse.





D'après Lacomme et al. 2016

Figure 38. SAPCD2 et LGN sont exprimées dans les progéniteurs rétiniens précoces

(A) Section de rétine de souris sauvage à E14.5, E16.5 et P0. Hybridation *in situ* avec une sonde Lgn antisens. RPL: couche des progéniteurs rétiniens, GCL: couches des cellules ganglionnaires. Échelle: 50 μm . Publié dans (Lacomme *et al.* 2016). (B-C) Marquage d'immunofluorescence de SAPCD2 (B) et LGN (C) à la membrane apicale, sur une section de rétine de souris sauvage à E14.5. Images acquises au confocal en faible magnification, flèches indiquant les progéniteurs en mitoses. Échelle: 7 μm . (D-M) Marquage d'immunofluorescence de SAPCD2 (D-H) et LGN (I-M) sur des sections de rétines de souris sauvages à E14.5. Images acquises au confocal. Grossissement sur les progéniteurs rétiniens en mitose, les flèches indiquent l'enrichissement de la protéine, les barres blanches épaisses indiquent l'absence d'expression à la membrane apicale (D', I, J). L'expression de SAPCD2 varie, deux exemples illustrent la prophase (D-D'), métaphase horizontale (E-E') et anaphase/télophase horizontale (F-F'). SAPCD2 n'est pas détectée dans les phases verticales (G-H). L'expression de LGN en prophase (I), métaphase horizontale (J), anaphase/télophase horizontale (K), métaphase verticale (L), anaphase/télophase verticale (M). Échelle: 2 μm .



L'expérience idéale pour étudier la localisation dynamique de SAPCD2 et LGN pendant les différentes phases de la mitose serait de filmer leur expression en temps réel dans des progéniteurs en division. Pour cela, nous pourrions transfecter des cellules par électroporation dans des rétines de souris sauvages à E13.5 avec des protéines de fusion SAPCD2 ou LGN couplées à des fluorochromes. Puis cultiver les rétines en explants, les filmer grâce à un microscope confocal *spinning-disc* pendant 36 heures. La limite de cette technique est que l'électroporation peut engendrer une forte expression conduisant à une mauvaise localisation des protéines de fusion. Nous pouvons réaliser la même expérience avec des explants infectés par un rétrovirus exprimant une protéine fluorescente couplée à SAPCD2 ou LGN.

SAPCD2 et LGN sont requis pour maintenir les divisions cellulaires planaires précoces

Dans un deuxième temps, comme la colocalisation précoce de SAPCD2 et LGN suggère une interaction et des rôles différents qu'à P0, nous nous sommes demandés quelle conséquence aurait leur absence à E14.5 sur l'orientation du fuseau mitotique des progéniteurs en division et la spécification du lignage rétinien.

Comme vu en introduction et dans le chapitre précédent, pour analyser l'orientation des progéniteurs rétiniens en divisions, nous avons mesuré l'angle entre le fuseau mitotique et la membrane apicale, en trois dimensions, lors des métaphases, anaphases et télophases (Chiu *et al.* 2016, Lacomme *et al.* 2016) (**figure 28A**). Les anticorps utilisés pour marquer les centrosomes des divisions cellulaires à E14.5 sont des marqueurs spécifiques de ninein et pericentrin.

Pour étudier la fonction de *Sapcd2* et *Lgn* ensemble *in vivo*, nous avons créé une souris double mutante *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*. Ces souris sont viables. Une expérience préliminaire dans les souris *Lgn* *+/-*; *Sapcd2* *-/-* à E14.5 montre une augmentation des divisions verticales par rapport aux souris contrôles *Lgn* *+/-*; *Sapcd2* *+/-* (**figure 39A**). À des stades de développement précoces et tardifs, *Sapcd2* régule les divisions horizontales. Cependant la localisation de SAPCD2 diffère à E14.5, suggérant un mécanisme d'action différent aux stades précoces que celui décrit à P0.



De façon surprenante, une expérience préliminaire dans les souris *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{+/-} cette fois, à E14.5, montre également une augmentation des divisions verticales (**figure 39A**). Alors qu'à P0, *Lgn* est requis pour la formation des divisions verticales. Précocement, il semble donc jouer le même rôle que *Sapcd2* dans la régulation des divisions horizontales. Nous concluons de ces premières expériences que le rôle de *Lgn* est modifié au cours de la rétino-genèse et qu'il semble nécessaire au maintien des divisions planaires à des stades précoces du développement.

D'après l'analyse des angles en trois dimensions, dans les souris contrôles doubles hétérozygotes *Lgn*^{+/-}; *Sapcd2*^{+/-} à E14.5, les divisions verticales et obliques représentent 14% de toutes les divisions cellulaires à la membrane apicale (**figure 39B-C**). Or, à E14.5, d'après l'étude préliminaire du simple hétérozygote *Lgn*, seulement 6% des divisions sont obliques-verticales (**figure 39E**), et dans les souris *Sapcd2*^{+/-}, seulement 3% des divisions sont obliques-verticales (**figure 39F**), suggérant que la double hétérozygotie de *Sapcd2* et *Lgn* augmente le nombre de divisions cellulaires réorientées par rapport à des rétines de souris sauvages. De plus, le nombre de divisions verticales augmente dans les souris *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{+/-}, avec 45% de divisions verticales (**figure 39A**), par rapport aux souris *Lgn*^{-/-} avec les deux allèles sauvages de *Sapcd2* qui présentent 30% de verticales (**figure 39E**), montrant un effet de l'hétérozygotie de *Sapcd2* seule. C'est aussi le cas si nous comparons les souris *Lgn*^{+/-}; *Sapcd2*^{-/-} (**figure 39A**) avec 33% de divisions verticales, par rapport aux souris *Sapcd2*^{-/-} et les deux allèles sauvages de *Lgn* avec 21% de verticales (**figure 39F**), suggérant que l'hétérozygote de *Lgn* seule a également un effet. Ces données suggèrent d'autre part que ces deux gènes agissent dans la même voie génétique. Afin de tester l'effet de la double hétérozygotie, nous pourrions mesurer les angles des divisions des progéniteurs dans des rétines de souris sauvages à E14.5, et de les comparer à des souris *Lgn*^{+/-}; *Sapcd2*^{+/-} et *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-}.

Dans les souris doubles mutantes *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-}, les divisions verticales, de 30° à 90°, augmentent drastiquement à 80%, à l'instar d'une sévère diminution des divisions horizontales (**figures 39B-C**). Ces résultats montrent que *Sapcd2* et *Lgn* sont requis précocement pour réguler les divisions planaires ensemble.



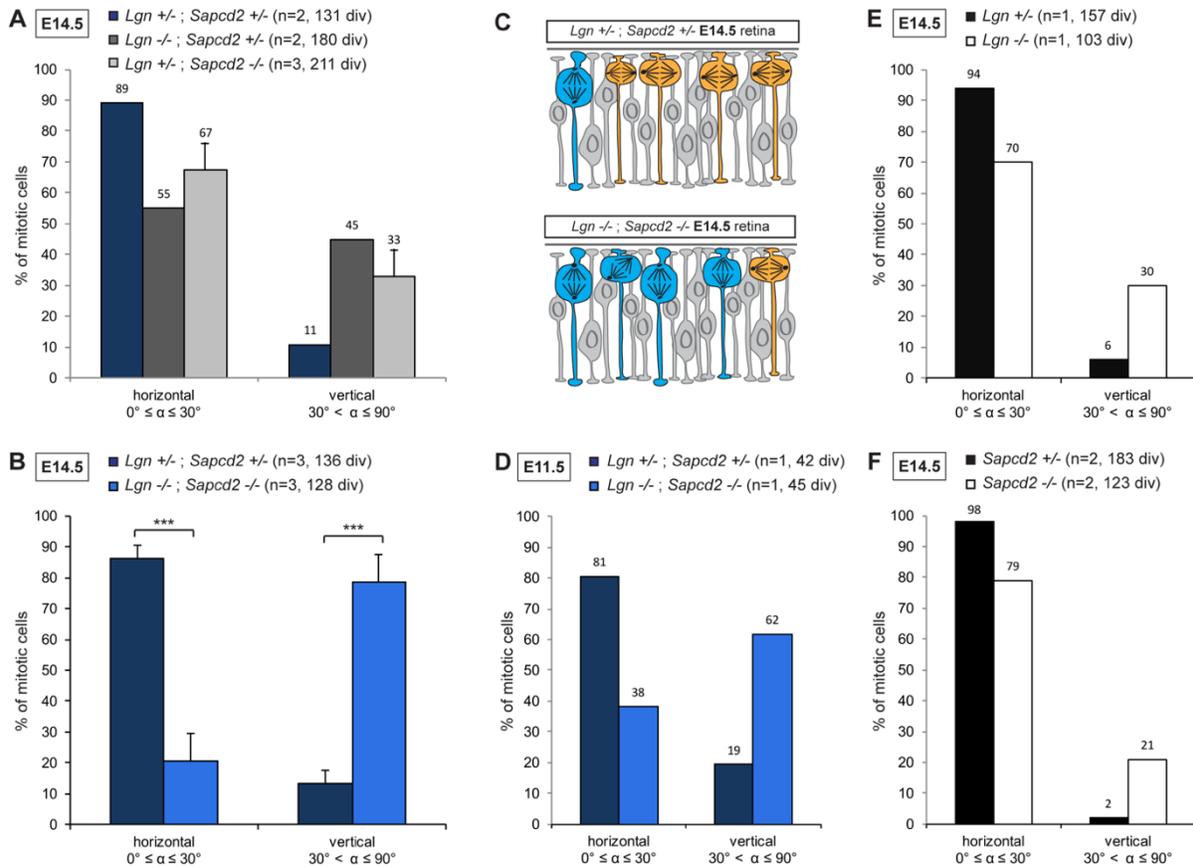


Figure 39. Précocement, SAPCD2 et LGN sont requis pour réguler les divisions planaires

Quantification de la distribution des angles de divisions des progéniteurs rétiniens. Les divisions cellulaires sont horizontales avec des angles de 0° à 30°, et verticales de 30° à 90°. La barre d'erreur représente la SEM. **(A)** Quantification en 2D, à E14.5 en anaphase/télophase, dans des souris *Lgn* +/- ; *Sapcd2* +/- (n=2, 131 div), *Lgn* -/- ; *Sapcd2* +/- (n=2, 180 div), *Lgn* +/- ; *Sapcd2* -/- (n=3, 211 div). **(B)** Quantification en 3D à E14.5 en métaphase, anaphase/télophase, dans des souris *Lgn* +/- ; *Sapcd2* +/- (n=3, 136 div), et *Lgn* -/- ; *Sapcd2* -/- (n=3, 128 div). *** p < 0.001, t-test de Student. L'inactivation de *Sapcd2* et *Lgn* à E14.5 augmente drastiquement les divisions verticales. **(C)** Schéma illustrant le résultat **(B)** avec l'augmentation des divisions verticales (bleu) et la diminution des divisions horizontales (orange). **(D)** Quantification en 2D à E11.5 en métaphase, anaphase/télophase, dans des souris *Lgn* +/- ; *Sapcd2* +/- (n=1, 42 div), et *Lgn* -/- ; *Sapcd2* -/- (n=1, 45 div). Résultat préliminaire. **(E)** Quantification en 2D à E14.5 en métaphase, anaphase/télophase, dans des souris *Lgn* +/- (n=1, 157 div), et *Lgn* -/- (n=1, 103 div). Résultat préliminaire. **(F)** Quantification en 2D à E14.5 en métaphase, anaphase/télophase, dans des souris *Sapcd2* +/- (n=2, 183 div), et *Sapcd2* -/- (n=2, 123 div). Résultat préliminaire.

Pour déterminer la fenêtre de temps lors de laquelle *Sapcd2* et *Lgn* maintiennent les divisions planaires, nous pourrions réaliser une analyse de l'orientation des divisions cellulaires



à différents stades du développement, dans des souris sauvages, doubles hétérozygotes et doubles mutantes. Un résultat très préliminaire indique qu'au début de la rétino-genèse, à E11.5, en l'absence de *Sapcd2* et *Lgn*, nous observons déjà la même tendance d'une augmentation des divisions verticales au détriment des horizontales (**figure 39D**).

D'après ces différentes expériences, dans les progéniteurs rétiniens précoces, SAPCD2 et LGN fonctionnent de manière redondante pour maintenir les divisions planaires, contrairement à P0, où elles sont complémentaires pour réguler les divisions horizontales et verticales, respectivement.

Dans l'épiderme de souris en développement, les divisions cellulaires sont par défaut planaires, dans le sens de l'axe le plus long de la cellule (Williams *et al.* 2011). C'est seulement grâce aux acteurs de polarité et d'orientation du fuseau mitotique, que le fuseau mitotique est positionné dans l'axe apico-basal (Lechler et Fuchs 2005, Williams *et al.* 2014). Dans la rétine, il est également estimé que les divisions cellulaires se font par défaut à l'horizontale. Or le fait qu'à E14.5, *Sapcd2* et *Lgn* soient tous deux nécessaires à la production des divisions horizontales (**figure 39B**), et que l'inactivation de l'un des deux suffise à réorienter le fuseau mitotique à la verticale (**figure 39A**), nous laisse supposer qu'aux stades précoces, les divisions des progéniteurs rétiniens se font par défaut à la verticale.

La rareté des divisions cellulaires verticales aux stades embryonnaires précoces rend leur étude difficile. Ce phénotype inédit de 80% de divisions cellulaires verticales dans la rétine en développement d'une souris mutante (**figure 39B**) va nous aider à étudier leur rôle dans le devenir des cellules filles.

L'absence de *Sapcd2* et *Lgn* engendre une malformation du cerveau, et affecte sévèrement la rétino-genèse avec une augmentation de la population du nombre neuronale

Même si les souris doubles mutantes sont viables, adultes elles présentent une hydrocéphalie (**figure 40A**) et un volume ventriculaire supérieur à celui des souris *Lgn +/-*; *Sapcd2 +/-* (**figure 40B**).



De façon intéressante, il est à noter que dans les rétines du simple mutant *Sapcd2* à P14, lorsque tous les types cellulaires sont formés, des cellules bipolaires (**figure 40C**) et photoréceptrices (**figure 40D**) sont localisées de façon ectopique dans la couche des cellules ganglionnaires. Cette observation suggère que l'augmentation des divisions cellulaires verticales impacte la neurogenèse.

L'inactivation cumulée de *Sapcd2* et *Lgn* amplifie le phénomène de délocalisation de neurones. Les souris *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* adultes présentent des défauts d'organisation des types cellulaires de la rétine et une augmentation drastique de la population neuronale, comme l'atteste la coloration hematoxylin et eosin d'une section de rétine de souris adulte *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* (**figure 40E**), qui montre une couche nucléaire supplémentaire (**figure 40E, étoile**). Pour caractériser la composition cellulaire des différentes couches, nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques spécifiques des différents types cellulaires rétiniens (**figure 40F-L**). La couche de noyaux supplémentaires (**figure 40 étoile**) contient des amacrine (**figure 40F**), des cellules ganglionnaires (**figure 40G**), des bipolaires (**figure 40H, J**), des Müllers (**figure 40I**) et des photorécepteurs (**figure 40L**). La couche des ganglionnaires (GCL) est aussi affectée, en plus des ganglionnaires (**figure 40G**) et des amacrine (**figure 40F**), elle contient des bipolaires (**figure 40H, J**) et des photorécepteurs (**figure 40L**). Une quantification de chaque type cellulaire avec plusieurs marqueurs et co-marqueurs sera nécessaire. L'inactivation de *Sapcd2* et *Lgn* augmente la population neuronale adulte.

Tous ces résultats suggèrent que les changements la réorientation du fuseau mitotique des progéniteurs à E14.5 affectent la neurogenèse de la rétine.



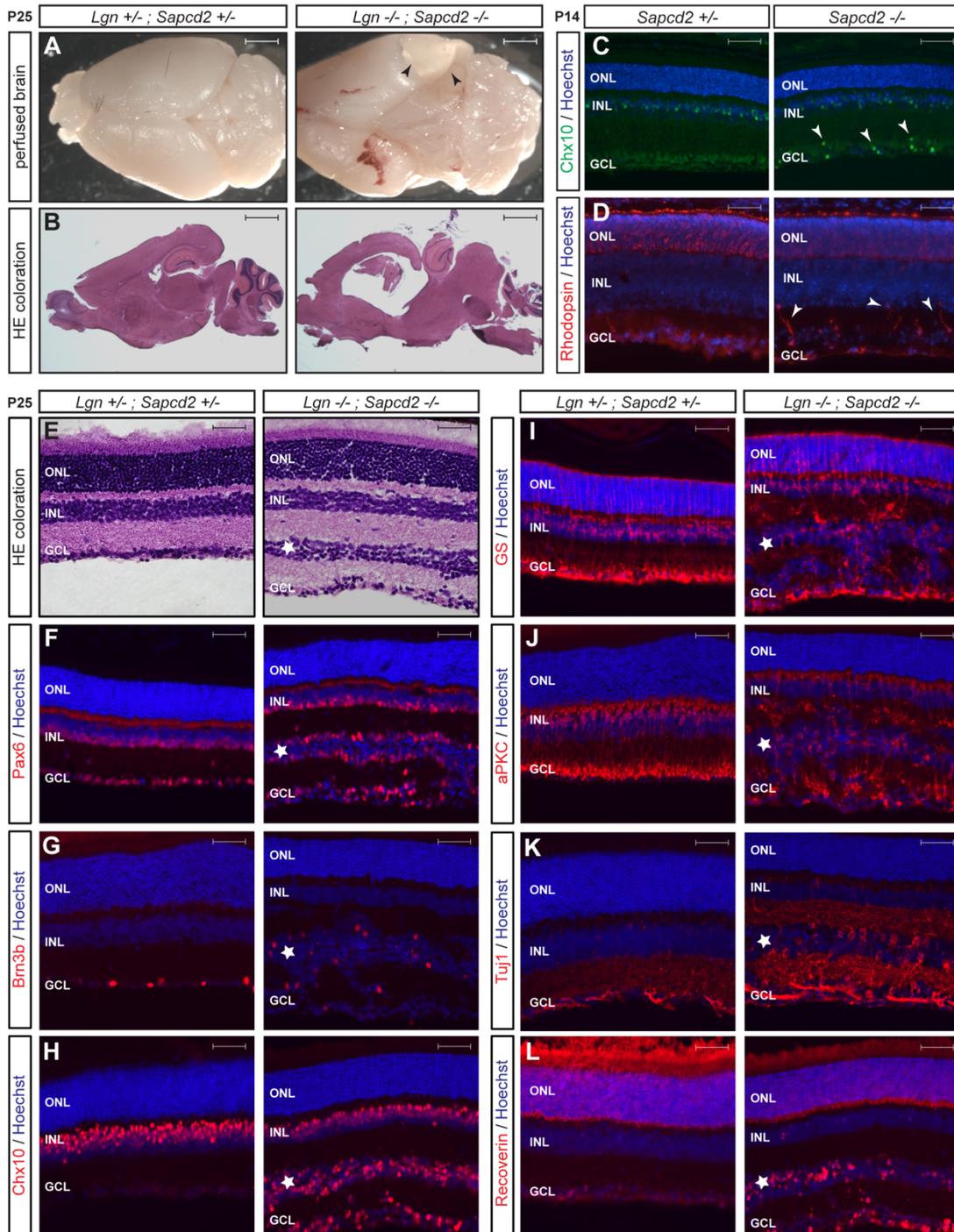


Figure 40. L'absence de *Sapcd2* et *Lgn* engendre une malformation du cerveau, et affecte sévèrement la rétino-genèse avec une augmentation de la population neuronale

(A) Photos de cerveaux de souris contrôles *Lgn* +/- ; *Sapcd2* +/- et doubles mutantes *Lgn* -/- ; *Sapcd2* -/- qui présentent une hydrocéphalie, avec un volume ventriculaire anormal, causant des dommages indiqués par les flèches noires. Échelle: 15 mm. (B) Coupes sagittales des cerveaux, colorées avec de



l'hématoxylin-eosin des souris contrôles *Lgn* +/-; *Sapcd2* +/- et *Lgn* -/-; *Sapcd2* -/- avec un trou dans la section, indiquant le volume important des ventricules. Échelle: 15 mm. **(C-D)** Sections de rétines de souris *Sapcd2* +/- et *Sapcd2* -/- à P14, avec un immunomarquage de CHX10, marqueur des cellules bipolaires (C), et rhodopsin, marqueur des photorécepteurs en bâtonnets (D). Flèches blanches : cellules délocalisées dans les souris *Sapcd2* -/-. ONL : couche nucléaire externe, INL : couche nucléaire interne, GCL : couche des cellules ganglionnaires. Échelle: 50 µm. **(E-L)** Sections de rétines adultes de souris contrôles *Lgn* +/-; *Sapcd2* +/- et doubles mutantes *Lgn* -/-; *Sapcd2* -/-. Coloration hématoxylin et eosin (E). Immunomarquage de PAX6, marqueur des amacrine et ganglionnaires (F), BRN3B, marqueur des cellules ganglionnaires (G), CHX10, marqueur des bipolaires (H), GS (*glutamine synthetase*), marqueur des cellules de Müller (I), aPKC, marqueur de sous-types de bipolaires (J), TUJ1 (*tubulin β3 class III*), marqueur des prolongements neuronaux (K) et recoverin, marqueur des photorécepteurs bâtonnets (L). Étoile blanche : couche nucléaire supplémentaire dans les souris *Lgn* -/-; *Sapcd2* -/-. ONL : couche nucléaire externe, INL : couche nucléaire interne, GCL : couche des cellules ganglionnaires. Échelle: 50 µm.

Précocement, *Sapcd2* et *Lgn* jouent un rôle dans la régulation de la prolifération

Nous faisons l'hypothèse que l'augmentation de la population neuronale observée dans les souris doubles mutantes, soit due à des défauts de prolifération. Pour adresser cette idée, nous avons injecté des femelles gestantes avec du BrdU pour marquer les cellules prolifératives. Les simples mutants *Sapcd2* ou *Lgn* ne montrent pas de défauts de prolifération ou d'apoptose (**figure 29D et 34A-B; figure 41A**). Cependant une double inactivation de *Sapcd2* et *Lgn* augmente le nombre de cellules ayant incorporé du BrdU. La taille de la région proliférative est plus importante en l'absence de *Sapcd2* et *Lgn* que dans les souris contrôles, à E14.5 et E16.5 (**figure 41B-C**). À P0, nous observons une augmentation du nombre de cellules, sans doute due à un défaut de prolifération (**figure 41D**). Nous concluons que *Sapcd2* et *Lgn* régulent la prolifération rétinienne.

Nous pensons que le changement drastique d'orientation des divisions planaires à une quasi-exclusivité de divisions verticales à un stade précoce du développement, augmente le nombre de progéniteurs basaux, et que l'augmentation de la population neuronale puisse être en partie causée par des divisions cellulaires non apicales, comme cela a pu être observé dans le cortex cérébral (Postiglione *et al.* 2011). Pour adresser cette hypothèse, nous avons marqué les cellules mitotiques dans des sections de rétines de souris mutantes pour *Sapcd2* ou *Lgn* à E14.5 et P0. De façon intéressante, en l'absence de *Sapcd2*, nous avons remarqué quelques mitoses



déplacées à P0 et P4 (**figure 41E**), mais non à E14.5, et aucune dans le mutant *Lgn* (**figure 41F**). Dans la souris *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-}, nous observons une drastique augmentation des mitoses non apicales à E14.5 et P0 (**figure 41G-H**).

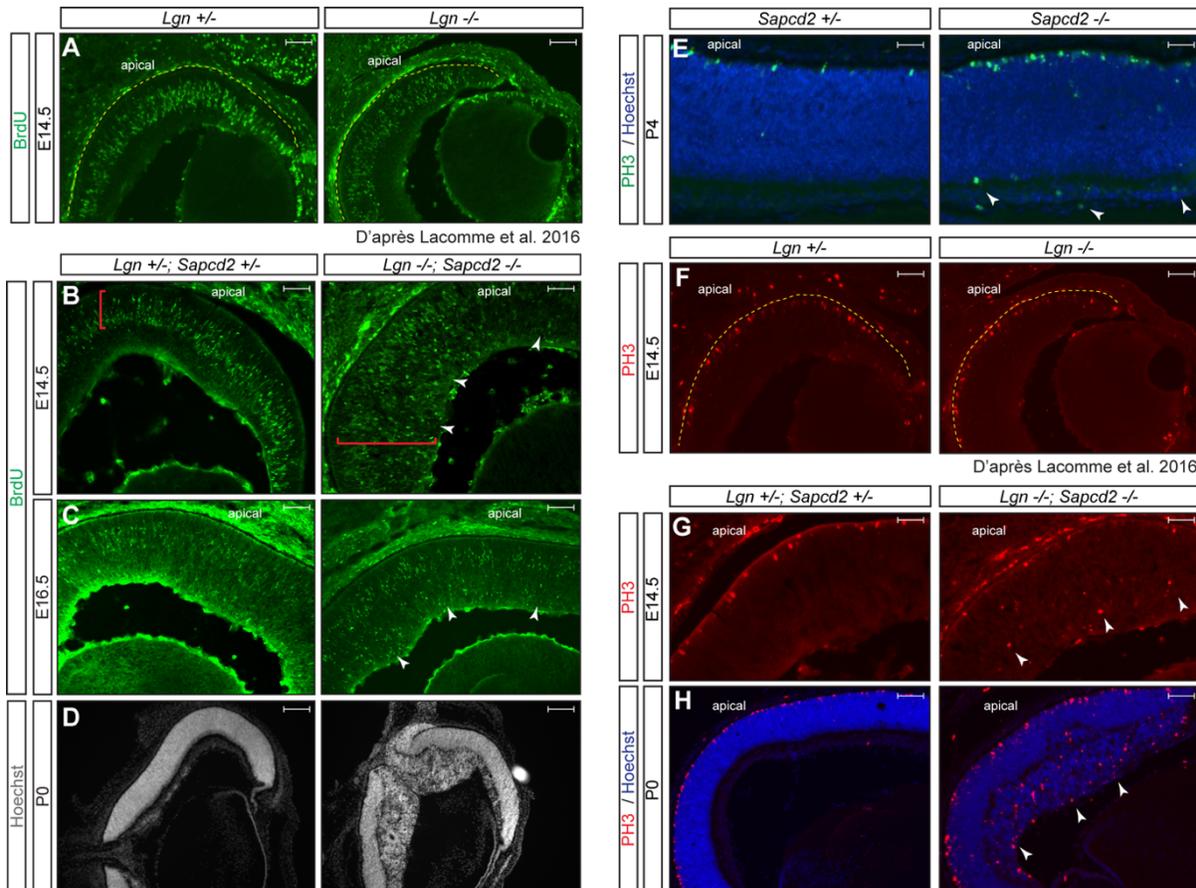


Figure 41. L'inactivation de *Sapcd2* et *Lgn* augmente la prolifération et les mitoses non apicales.

(A-C) Détection de BrdU une heure après l'incorporation dans des rétines à E14.5 (A-B) et E16.5 (C), de souris *Lgn*^{+/-} et *Lgn*^{-/-} (A), et *Lgn*^{+/-}; *Sapcd2*^{+/-} et *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-} (B-C). La ligne pointillée jaune délimite la membrane apicale. Les crochets rouges délimitent la zone proliférative. Les flèches blanches indiquent les progéniteurs déplacés. Échelle (A) : 64 µm, (B) : 50 µm, (C) : 70 µm. (A) Publié dans (Lacomme *et al.* 2016). (D) Marquage des noyaux cellulaires avec du Hoechst à P0 dans des souris *Lgn*^{+/-}; *Sapcd2*^{+/-} et *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-}, avec une expansion cellulaire dans la souris double mutante. Échelle : 115 µm. (E-H) Immunomarquage des cellules mitotiques avec un marqueur PH3 à P4 dans des souris *Sapcd2*^{+/-} et *Sapcd2*^{-/-} (E), à E14.5 sur des sections de rétines de souris *Lgn*^{+/-} et *Lgn*^{-/-} (F), à E14.5 (G) et P0 (H) dans des souris *Lgn*^{+/-}; *Sapcd2*^{+/-} et *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-} à E14.5. La ligne pointillée jaune délimite la membrane apicale. Les flèches blanches indiquent les cellules



mitotiques déplacées. Échelle (E-G) : 30 μm , (F) : 64 μm , (H) : 60 μm . (F) Publié dans (Lacomme *et al.* 2016).

L'augmentation du nombre de neurones dans les rétines adultes des souris doubles mutantes *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* peut être due à une sortie précoce du cycle cellulaire. Pour répondre à cette question, nous pourrions analyser la sortie du cycle cellulaire en injectant des femelles gestantes avec du BrdU, sacrifier les animaux 24 heures plus tard et faire un double marquage de BrdU et du marqueur de prolifération Ki67. Les cellules qui seront négatives pour Ki67 et qui auront incorporé le BrdU, indiqueront celles qui seront sorties du cycle cellulaire. Nous pouvons également investiguer le nombre de cellules apoptotiques, et dater les naissances des différents types cellulaires rétiniens.

Hypothèse/modèle pour la prolifération

Comment les divisions verticales des souris doubles mutantes *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* conduisent à une surpopulation neuronale ? Nous proposons un modèle où le changement du nombre de divisions planaires et verticales déséquilibre le nombre de cellules héritant des déterminants cellulaires neurogéniques ou prolifératifs.

Aux stades précoces de la rétino-genèse, les divisions planaires limiteraient la prolifération, tandis que les divisions verticales feraient accroître la population neuronale. Sachant que dans des rétines de rats sauvages, il y a très peu de divisions verticales aux stades embryonnaires, soit 3% (Cayouette *et al.* 2001), il est peu probable qu'elles assurent les 20 à 40% de divisions P/N observées à ces stades (Cohen *et al.* 2010, Gomes *et al.* 2011, Kechad *et al.* 2012). Cependant, les cellules formées par ces divisions verticales précoces pourraient produire deux progéniteurs différents Pa/Pb. Pour vérifier ces divisions verticales précoces produisent des divisions P/N, nous pouvons déterminer le devenir des divisions verticales en infectant des explants de rétine à E14.5 dans des souris contrôles et des souris *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*, avec un vecteur exprimant la GFP, puis analyser la composition des clones deux cellules seulement trois jours après, à l'aide de marqueurs spécifiques de la prolifération et des neurones naissants. Nous saurons si la réorientation des divisions horizontales à la verticale conduit à une perturbation de la balance symétrique/asymétrique, alors que nous sommes dans la phase proliférative de la neurogenèse. Cependant cette approche ne permet pas de savoir si les deux



progéniteurs sont identiques ou différents. En effet, considérant le phénotype d'hyperprolifération, nous anticipons une augmentation des divisions cellulaires produisant deux progéniteurs (P/P) dans les souris doubles mutantes *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*. Cependant, comme dit ci-dessus, il est possible que les divisions verticales précoces génèrent des divisions asymétriques Pa/Pb. Le progéniteur basal aurait une capacité proliférative supérieure au progéniteur apical, comme les progéniteurs externes décrits dans le cerveau (Fietz *et al.* 2010, Hansen *et al.* 2010). Si tel est le cas, même si les divisions verticales précoces sont en faible quantité dans une souris sauvage, elles contribueraient grandement à l'amplification du nombre de neurones, comme le font les progéniteurs externes dans la neurogenèse corticale (Fietz *et al.* 2010, Hansen *et al.* 2010). Or l'orientation du fuseau mitotique est montrée comme étant capitale à la production de cette population de progéniteurs externes (Shitamukai *et al.* 2011, Wang *et al.* 2011, LaMonica *et al.* 2013).

Si le progéniteur basal des divisions verticales précoces est effectivement hyperprolifératif par rapport au progéniteur apical, nous déconstruisons le dogme qui établit que les progéniteurs rétinien sont équipotents.

Notre laboratoire a montré que le déterminant cellulaire mNUMB, antagoniste de Notch, est localisé à la membrane apicale des progéniteurs rétinien tardifs et requis pour les divisions terminales neurogéniques asymétriques Na/Nb (Cayouette 2003, Kechad *et al.* 2012). L'absence de *Sapcd2* et *Lgn* n'altère pas la localisation de mNUMB dans les progéniteurs à P0 (**figure 34**). Nous proposons que mNUMB est la même localisation précocement en absence de *Sapcd2* et *Lgn*, ce que nous pourrions vérifier par immunohistochimie dans les progéniteurs rétinien en division de souris *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*. Si tel est le cas, comme à P0, les divisions planaires observées à E14.5 permettraient d'hériter symétriquement de mNUMB, tandis que dans les quelques divisions verticales, seule la cellule fille apicale en hériterait (**figure 42**). mNUMB étant antagoniste de Notch, le progéniteur basal qui n'en hérite pas, aura une activité proliférative supérieure à sa cellule-sœur apicale (**figure 42**), comme proposé dans la neurogenèse du poulet (Das et Storey 2012). Tandis que le progéniteur apical qui a hérité de mNUMB et qui a par conséquent une faible activité de Notch, aura un potentiel prolifératif limité, comme ceux générés par les divisions planaires (**figure 42**).



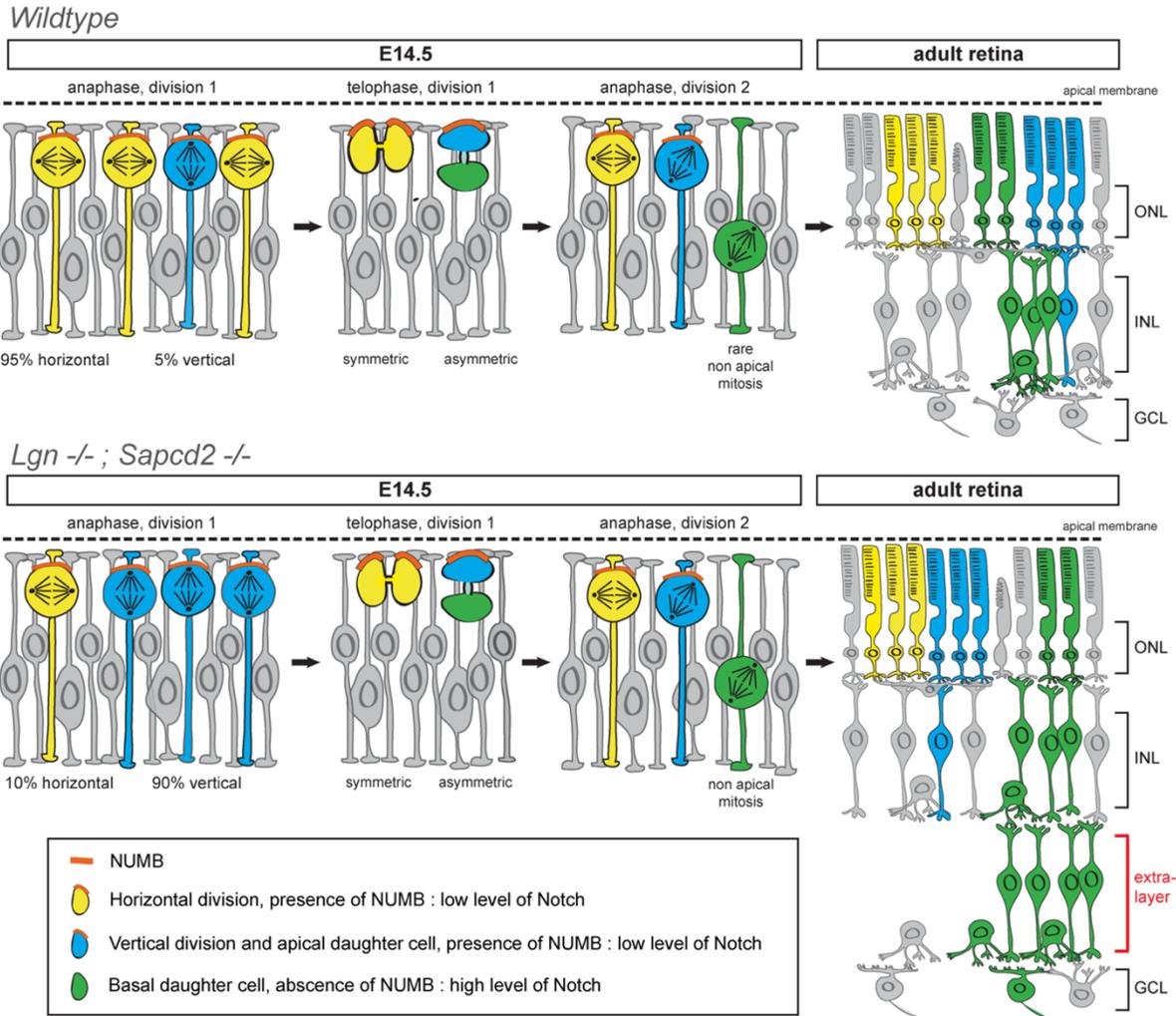


Figure 42. Modèle d'hyperprolifération

À E14.5 dans une rétine de souris sauvage, la majorité des divisions cellulaires sont horizontales (95%) (jaunes), elles distribuent NUMB (orange) symétriquement, qui inhibe l'activité de Notch dans les cellules filles, limitant leur capacité proliférative. Tandis qu'après une division verticale (bleu), comme 5% des divisions cellulaires d'une souris sauvage et 90% des divisions cellulaires d'une souris *Lgn^{-/-}; Sapcd2^{-/-}* à E14.5, NUMB est héritée seulement dans le progéniteur apical, qui aura une faible activité de Notch. Le progéniteur basal (vert) qui n'hérite pas de NUMB, aura une plus forte activité de Notch, ce qui augmentera son potentiel prolifératif. Sa descendance sera plus importante que celle de la cellule apicale. ONL : couche nucléaire externe, INL : couche nucléaire interne, GCL : couche des cellules ganglionnaires.

Pour tester l'hypothèse d'un progéniteur rétinien basal au potentiel prolifératif supérieur au progéniteur apical dû à l'héritage différentiel de mNUMB, nous anticipons que la surexpression de mNUMB dans les progéniteurs rétinien mime l'effet d'une exclusivité de



divisions cellulaires horizontales symétriques, générant des progéniteurs au potentiel prolifératif limité, et une diminution de la prolifération. En effet, nous avons réalisé une surexpression de mNUMB dans les progéniteurs rétiniens à E13.5 d'une souris sauvage. Comme attendu, cette surexpression engendre une diminution de la taille des clones, soit une diminution de la prolifération (**figure 43**). Cette expérience pourra être répétée avec des souris doubles mutantes, dans lesquelles la surexpression de mNUMB sera réalisée *in vivo* dans les progéniteurs rétiniens précoces. Nous anticipons qu'une certaine proportion des 80% de divisions cellulaires verticales asymétriques des souris doubles mutantes, soit infectée et devienne symétrique de par la surexpression de mNUMB dans les deux cellules filles. Ainsi la taille des clones devrait diminuer drastiquement dans les souris *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-} avec la surexpression de mNUMB, comparée aux souris sans surexpression ; et le phénotype d'hyperprolifération observé dans les souris doubles mutantes devrait être contrecarré par la surexpression de mNUMB. En d'autres termes, nous anticipons que la surexpression de mNUMB dans les souris *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-} rétablit la prolifération de façon similaire à celle d'une souris *Lgn*^{+/+}; *Sapcd2*^{+/+}.

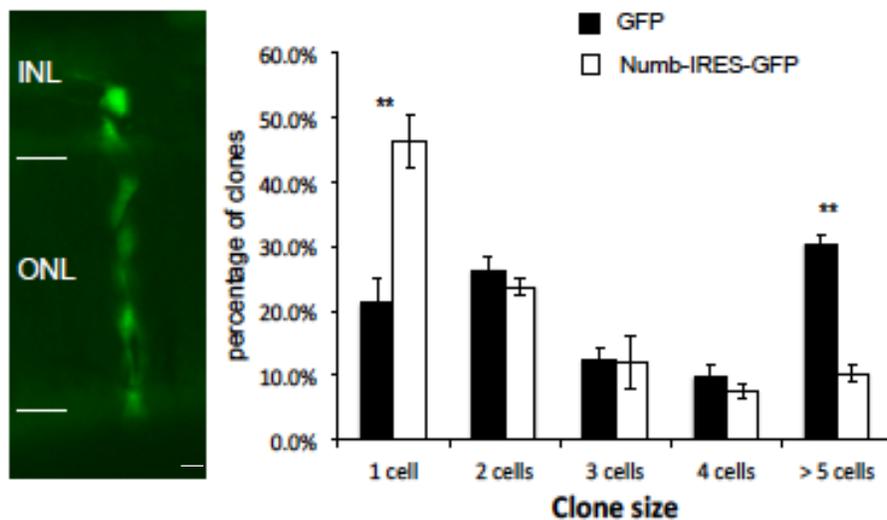


Figure 43. La surexpression de mNUMB dans des progéniteurs rétiniens précoces diminue la prolifération.

Exemple d'un clone contenant plus de 5 cellules. INL : couche nucléaire interne, ONL : couche nucléaire externe. Échelle : 8 μ m. Graphique représentant la moyenne du nombre de cellules par clone, 14 jours après l'infection dans des rétines de souris sauvages à E13.5 avec un rétrovirus GFP ou avec le vecteur Numb-IRES-GFP, surexprimant *Numb*. Les clones composés d'une cellule (*1 cell*) augmentent significativement en cas de surexpression de mNUMB, tandis que les plus gros clones, composés de plus



de 5 cellules (>5 cells) diminuent. La barre d'erreur représente la SEM, la p value indique le t -test de Student. $**p \leq 0.01$

Pour quantifier l'activité de Notch, et s'assurer de sa corrélation avec l'expression de mNUMB dans les cellules filles après une division horizontale ou verticale, nous pouvons transfecter des cellules par électroporation d'explants de rétine de souris contrôles et doubles mutantes *Lgn* $-/-$; *Sapcd2* $-/-$ avec un reporter fluorescent de l'activité de Notch, comme *Hes1-luciferase*, et suivre sa détection dans les cellules filles par imagerie en temps réel.

L'expérience la plus prometteuse pour tester l'hypothèse de la cellule fille basale hyperproliférative à des stades précoces de la rétino-genèse consistera à filmer en temps réel des divisions de progéniteurs dans des explants de rétine, préalablement infectés avec un rétrovirus exprimant une protéine fluorescente dérivée de la GFP, ayant la propriété d'être photoconvertie en rouge, après une très courte exposition à la lumière UV grâce au microscope confocal (**figure 44A**). Pour connaître le lien entre l'orientation et le devenir des cellules filles précocement, leur destin sera analysé et comparé à l'enregistrement de l'orientation de la division des progéniteurs infectés, avec le même protocole qu'utilisé dans des rétines de rats (Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005). Nous augmentons la probabilité de trouver des divisions verticales en utilisant la souris double mutante *Lgn* $-/-$; *Sapcd2* $-/-$. Nous photoconvertirons la cellule basale d'une division verticale, de verte à rouge (**figure 44A-B, les deux étoiles**), comme cela a été fait dans le tube neural de poulet (Das et Storey 2012), de poisson-zèbre (Buckley *et al.* 2016) et dans la rétine de poisson-zèbre (He *et al.* 2012). Après quelques cycles de divisions cellulaires, nous fixerons les explants et analyserons la proportion de cellules rouges et vertes dans les clones formés, pour différencier la capacité proliférative des cellules filles apicales et basales (**figure 44A-B, une étoile**). Nous pouvons utiliser les quelques divisions horizontales comme contrôles dans la même rétine, ainsi que des souris contrôles sauvages et *Lgn* $+/-$; *Sapcd2* $+/-$. Nous nous attendons à ce que la cellule basale rouge se divise plus, et donc à observer plus de cellules rouges que de vertes dans les clones (**figure 44B**). En comparant des divisions planaires et verticales, nous nous attendons à ce que les clones résultants des planaires soient plus petits que ceux formés par les verticales. En gardant à l'esprit que de par la structure des explants sur la membrane, il existe un faible risque de cibler une division cellulaire non apicale.



Nous avons déjà validé le vecteur photoconvertible, les conditions d'enregistrement des divisions en temps réel, les paramètres et l'efficacité de la photoconversion (**figure 44C**).

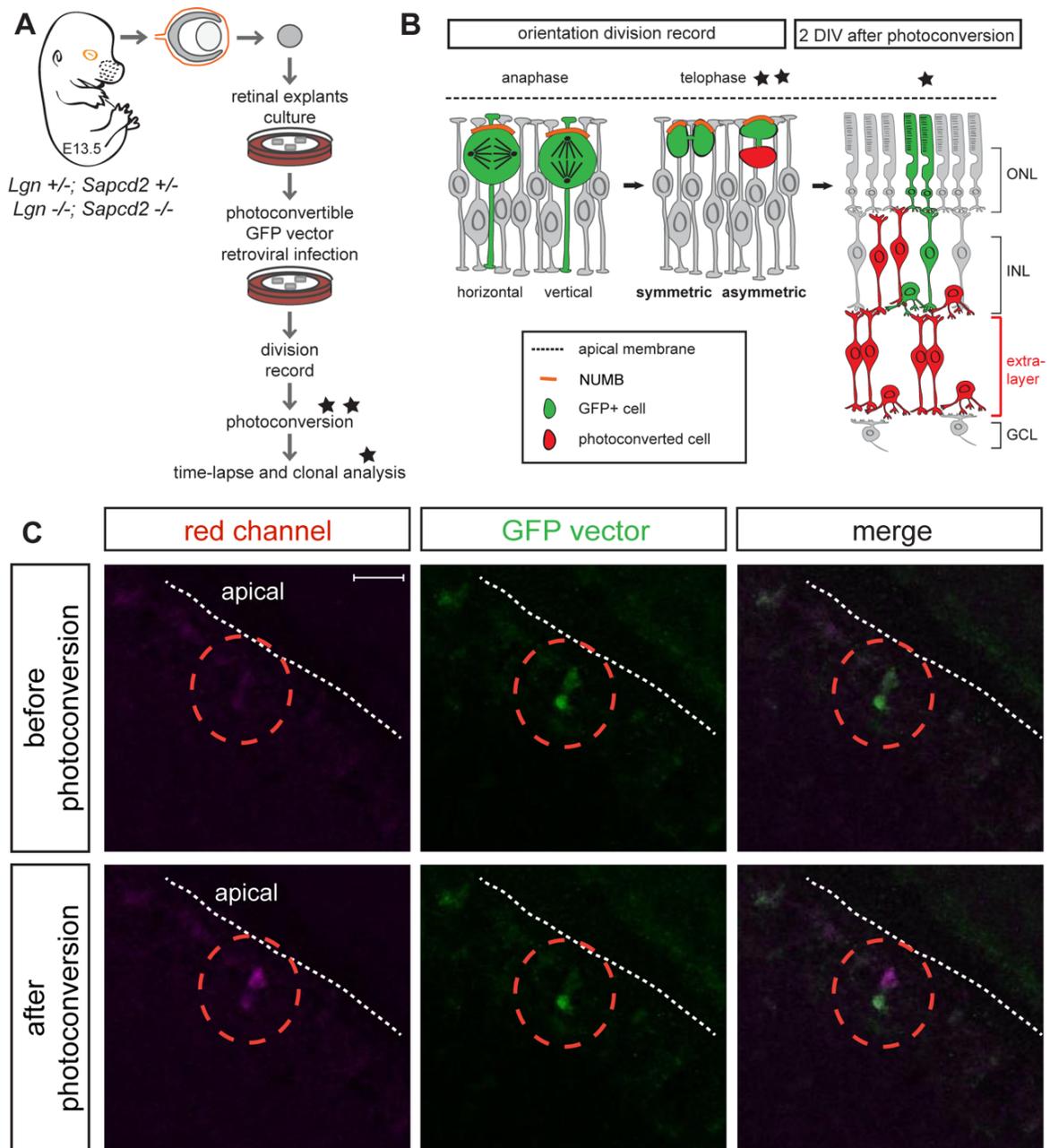


Figure 44. Photoconversion et enregistrement par imagerie en temps réel de progéniteurs en division dans des explants de rétine.

(A) Schéma illustrant le protocole pour l'analyse clonale. Les explants de rétine de souris *Lgn* +/-; *Sapcd2* +/- et *Lgn* -/-; *Sapcd2* -/-, sont infectés à E13.5 avec un rétrovirus photoconvertible dérivé de la GFP, CAGGS-KikGR. La division des progéniteurs infectés est filmée. Le progéniteur basal issu



d'une division verticale est photoconvertie. Puis les explants sont filmés de nouveau pendant 72h, avant d'être fixés. La composition des clones en cellules rouges et vertes est analysée. **(B)** Schéma des progéniteurs rétiniens en division horizontale et verticale. NUMB est héritée symétriquement après la division horizontale, et seulement dans le progéniteur apical après la division verticale. Le progéniteur basal (rouge) qui n'hérite pas de NUMB est photoconvertie (deux étoiles) pour pouvoir suivre sa descendance en rouge. Proposé hyperprolifératif, nous devrions observer plus de cellules rouges que vertes lors de l'analyse clonale deux jours après la photoconversion (une étoile). ONL : couche nucléaire externe, INL : couche nucléaire interne, GCL : couche des cellules ganglionnaires. **(C)** Progéniteur en télophase visualisé avant (en haut) et après (en bas) la photoconversion. Avant la photoconversion, seule l'émission verte est détectée dans les deux cellules filles. Après la photoconversion, ici de la cellule apicale parce que son intensité de GFP était plus faible, la cellule basale est toujours verte, et la cellule apicale est désormais détectée dans les longueurs d'onde rouges. Le cercle pointillé rouge délimite la cellule en télophase. La ligne pointillée blanche délimite la membrane apicale.

L'inactivation clonale de *Sapcd2* en absence de *Lgn*, augmente le nombre de cellules bipolaires et Müller, et n'affecte pas la prolifération

Pour savoir si les défauts de neurogenèse observés dans les souris *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* sont cellulaires autonomes, nous avons inactivé *Sapcd2* de façon clonale dans des progéniteurs rétiniens individuels de souris sauvages ou de souris *Lgn* *-/-* à E14.5 (**figure 45A**). Nous avons infecté des explants de rétines à E14.5 avec un rétrovirus exprimant soit un reporter fluorescent seul ou un *shARN* pour inactiver *Sapcd2*, le même qu'utilisé dans le chapitre précédent (**figure 35**). 21 jours après l'infection, soit 21 divisions cellulaires plus tard, nous analysons le nombre de cellules par clone, ainsi que leur composition cellulaire à l'aide de la position des cellules, leur morphologie et des marqueurs spécifiques des cellules bipolaires et amacrines.

Le nombre de cellules bipolaires et Müller augmente dans les explants où *Sapcd2* et *Lgn* sont désactivés, ce qui pourrait correspondre à la formation de la couche neuronale surnuméraire dans les souris *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* (**figure 45B**). Cependant le nombre de photorécepteur n'augmente pas, et après trois semaines en culture, la couche des cellules ganglionnaires n'a pas adhéré et survécu, seules les couches cellulaires INL et ONL sont observables. Les neurones surnuméraires seraient peut-être augmentés si tel était le cas. Pour pallier cette contrainte technique, nous pourrions réaliser la même expérience avec une infection *in utero* de rétines d'embryons à E14.5, et sacrifier les animaux au stade P14 lorsque tous les types cellulaires sont



formés. Les cellules surnuméraires auront alors pu migrer dans la couche de neurones dupliquée et/ou dans la couche des cellules ganglionnaires.

Contrairement à ce que nous avons envisagé, la taille des clones, qui reflète la prolifération des cellules, n'est pas différente dans les souris *Lgn*^{-/-} infectées avec le *shARN* contre *Sapcd2*, que dans les souris contrôles (**figure 45C**). Ce résultat indique que l'inactivation de *Sapcd2* seulement à partir de E14.5, ne suffit pas pour augmenter la prolifération, même en l'absence de *Lgn*. Trois explications sont à envisager : l'effet peut être cellulaire autonome, mais nécessitant l'inactivation clonale de *Sapcd2* plus tôt qu'à E14.5 ; ou bien *Sapcd2* doit être inactivé génétiquement en amont de *Lgn*, qui pourrait lui être désactivé de façon clonale ; ou encore, le phénotype de prolifération n'est pas dû à un mécanisme cellulaire autonome et l'inactivation génétique de *Sapcd2* et *Lgn* dans toute la rétine est nécessaire.

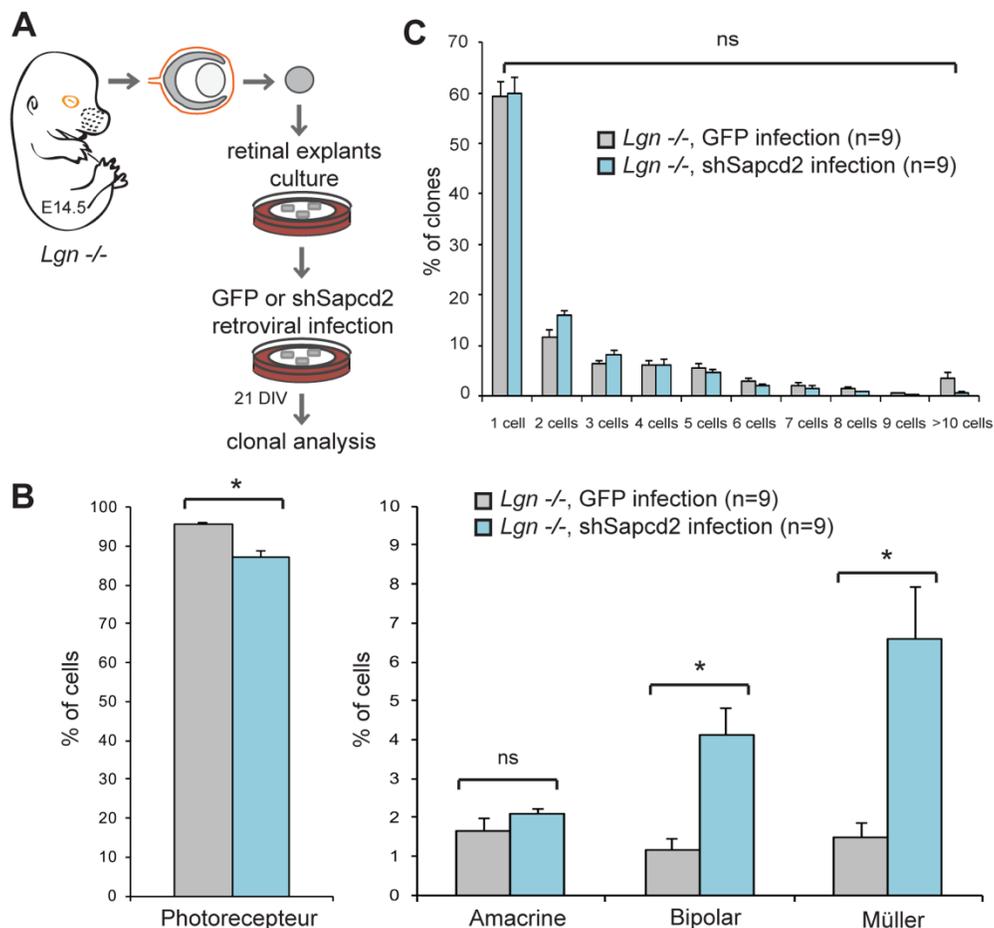


Figure 45. L'inactivation clonale de *Sapcd2* en l'absence de *Lgn* augmente le nombre de cellules bipolaires et Müller, et n'affecte pas la prolifération.

(A) Schéma illustrant le protocole pour l'analyse clonale. Les explants de rétine de souris *Lgn*^{-/-} sont infectés à E14.5 avec un rétrovirus GFP, ou avec un *shARN* contre *Sapcd2*, puis sont fixés 21 jours après, pour analyser les clones composés de deux cellules (B), le nombre des différents types cellulaires (C) et la taille des clones (D). (B-C) Infection avec un rétrovirus GFP, ou avec un *shARN* contre *Sapcd2*. n=9 animaux par condition. La barre d'erreur représente la SEM, la *p* value indique le *t*-test de Student. **p* ≤ 0.05. (B) Nombre total des différents types cellulaires, avec une augmentation significative des bipolaires et des Müllers et une diminution des photorécepteurs, en l'absence de *Sapcd2* et *Lgn*. (C) Moyenne du nombre de cellules par clone, qui n'est pas significativement différente avec ou sans *Sapcd2*.

Pour mieux comprendre l'effet de l'inactivation de *Lgn* seul, nous devrions réaliser la même expérience avec des explants de souris *Lgn*^{+/+} appartenant aux mêmes portées.

D'autres stratégies expérimentales ont été testées pour savoir si le phénotype observé dans les souris *Lgn*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-} résulte d'un mécanisme cellulaire autonome. Nous avons croisé la lignée de souris *Lgn* *flox* générée au laboratoire (Tarchini *et al.* 2013), avec la lignée de souris *Sapcd2*^{-/-}, utilisée dans le chapitre précédent (Murata *et al.* 2004), pour obtenir des souris contrôles *Lgn* *fl*^{+/+}; *Sapcd2*^{-/-}, ou *Lgn* *fl*^{+/+}; *Sapcd2*^{+/+}, et des souris *Lgn* *fl*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-} et *Lgn* *fl*^{-/-}; *Sapcd2*^{+/+}. Une infection avec un rétrovirus CRE permet d'inactiver *Lgn* au temps choisi.

Dans des explants mis en culture à E14.5 pendant trois semaines, nous anticipons que la taille des clones soit plus grande en l'absence de *Sapcd2* et *Lgn*, que dans les souris contrôles. Pourtant, l'analyse clonale de souris *Lgn* *fl*^{+/+}; *Sapcd2*^{-/-} comparée à des souris *Lgn* *fl*^{-/-}; *Sapcd2*^{-/-} ne montre pas de différence. Peut-être que le phénotype de prolifération n'est pas cellulaire autonome, ou que la CRE infectée par rétrovirus a une latence avant d'être active, ou encore que la demie-vie de LGN est longue, ce qui retarde son inactivation par la CRE.

L'anticorps utilisé pour analyser l'expression de la protéine LGN, reconnaît aussi son homologue AGS3 (Konno *et al.* 2008, Lacomme *et al.* 2016). Donc nous ne pouvons pas nous assurer de la perte clonale de LGN par immunohistochimie. Si l'hypothèse de l'inactivation tardive de *Lgn*, due à la latence de la CRE ou sa demi-vie, est vraie, notre alternative est de réaliser la même expérience à des stades antérieurs à E14.5 pour maximiser les probabilités



d'une délétion de LGN aux environs de E14.5. À partir d'explants mis en culture à E13.5 pour 22 jours, nous obtenons les mêmes résultats qu'à E14.5 plus 21 jours. À partir de E12.5 plus 23 jours, les explants ne se développent pas correctement en culture et ne sont pas analysables.

L'autre idée consiste à cultiver des explants de rétine de souris doubles mutantes *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* à E14.5 plus 21 jours, comparées à des souris contrôles *Lgn* *+/-*; *Sapcd2* *+/-*, infectées par un rétrovirus exprimant la protéine GFP. Il se pourrait qu'il soit difficile de les cultiver aux vues des défauts d'organisation des rétines de souris doubles mutantes *in vivo*. Si les explants croissent en culture, nous nous attendons à des clones plus grands dans les souris doubles mutantes par rapport aux souris contrôles. Comme expliqué plus haut, il faut garder à l'esprit que la couche des cellules ganglionnaires ne survit pas en culture. L'expérience idéale serait d'infecter un rétrovirus exprimant la protéine GFP *in utero* dans des rétines d'embryons à E14.5. Ainsi, les neurones surnuméraires pourront migrer dans la couche de neurone supplémentaire et/ou dans la couche des cellules ganglionnaires.

Deux autres stratégies d'analyses clonales *in vivo* seront testées pour savoir si le mécanisme d'action de *Sapcd2* et *Lgn* est cellulaire autonome. D'une part, nous sommes en train de croiser la lignée de souris doubles mutantes *Lgn*; *Sapcd2* avec la lignée de souris *IKCre-F*, générée au laboratoire (Tarchini *et al.* 2012), dans laquelle le reporter YFP est détecté à partir de E10 jusqu'à chez l'adulte dans des clones isolés. Le but est d'obtenir une délétion clonale de *Sapcd2* et *Lgn* à partir de E10, *in vivo*, sans avoir à faire d'infection. D'autre part, nous croisons la lignée de souris doubles mutantes *Lgn*; *Sapcd2* avec la lignée de souris *GlastCreER* dans laquelle l'activité de la CRE est inductible par une injection de tamoxifène, qui permet une délétion clonale *in vivo* à un temps et en une quantité déterminés (Slezak *et al.* 2007).

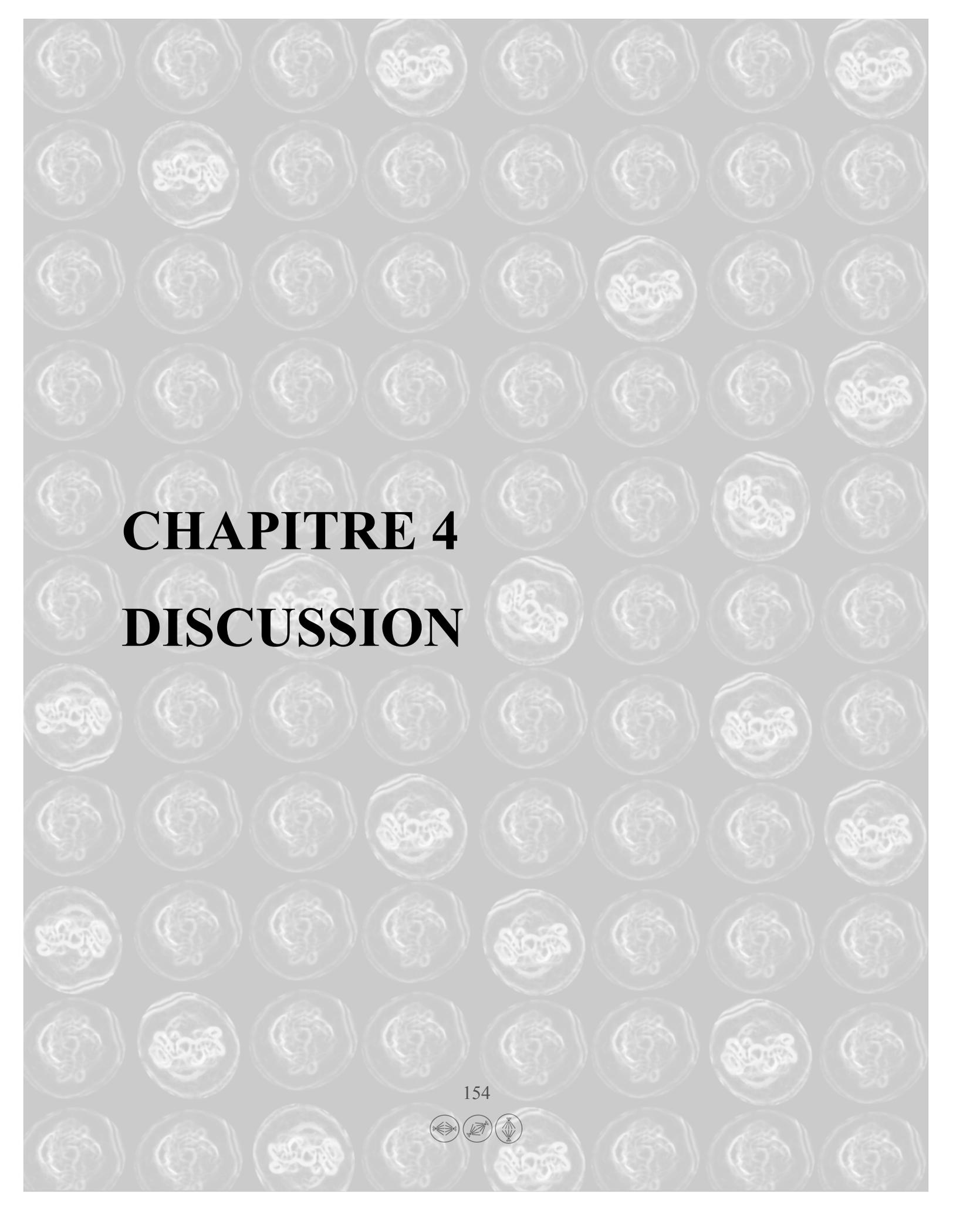
La surexpression de SAPCD2 et/ou LGN nous permettra de valider la redondance de leur fonction précoce, et à l'inverse, la complémentarité de leur rôle tardif. En surexprimant LGN dans des explants mis en culture à E14.5 ou P0, ou SAPCD2 à E14.5, nous nous attendons à ce que l'orientation des progéniteurs en division soit randomisée, et donc à une baisse des divisions horizontales par rapport aux souris contrôles, ce qui engendrerait une baisse des divisions symétriques. Nous nous attendons à une légère augmentation de la prolifération



comparée aux souris contrôles, bien moindre que dans la souris double mutante, due à l'augmentation des divisions verticales et à notre hypothèse de cellule-fille basale hyperproliférative. Comme SAPCD2 semble avoir un rôle différent à E14.5 et P0, nous présumons un effet différent de sa surexpression à P0. Nous avons montré qu'à P0, SAPCD2 agit comme régulateur négatif de LGN (**figure 30**) et que la surexpression de SAPCD2 dans des cellules HeLa délocalise LGN du cortex cellulaire (**figure 30A**). Nous faisons l'hypothèse qu'en surexprimant SAPCD2 dans des progéniteurs rétiniens à P0, LGN soit absent du cortex cellulaire et que cela mime l'effet observé dans l'analyse clonale des souris mutantes pour *Lgn*, soit une augmentation des divisions horizontales conduisant à une augmentation des divisions terminales symétriques, qui forment deux photorécepteurs.

Si le phénotype de prolifération n'est pas un phénomène cellulaire autonome, nous pouvons nous concentrer sur une seconde hypothèse basée sur les interacteurs de SAPCD2 identifiés par notre criblage protéomique (**figure 25A**). *Sapcd2* et *Lgn* pourraient réguler la prolifération rétinienne *via* leur interaction avec des protéines du cycle cellulaire ou des jonctions cellulaires. En premier lieu, il faudrait étudier l'expression de ces protéines dans la rétine par immunofluorescence et hybridation *in situ* et confirmer leur interaction avec SAPCD2 et/ou LGN par des co-immunoprécipitations, à partir d'extraits de rétine. Nous pourrions ensuite explorer la fonction des protéines validées par des expériences de perte et gain de fonction, avec des *shARN* et des vecteurs de surexpression dans des explants de rétine de souris contrôles et *Lgn* $-/-$; *Sapcd2* $-/-$, en se concentrant sur l'analyse de la taille des clones et leur composition. Si l'une de ces protéines permet de pallier au phénotype d'hyperprolifération, nous concluons que *Sapcd2* et *Lgn* ont un mécanisme de régulation de la prolifération qui dépend de l'une de ces protéines. Et nous analyserons les domaines qui permettent leur interaction, et les liens entre la structure et la fonction de la protéine à l'aide d'expériences de perte et gain de fonction de protéines tronquées. Des protéines interactrices de SAPCD2 (**figure 25A**) candidates pour un mécanisme d'action de régulation de la prolifération sont décrites dans le chapitre suivant, de discussion.





CHAPITRE 4
DISCUSSION



Chapitre 4 : Discussion générale

I. Conclusion

En **résumé**, tôt dans le développement rétinien, à **E14.5**, SAPCD2 et LGN sont toutes deux localisées aux pôles du fuseau mitotique (**figure 46**). Elles régulent les divisions cellulaires planaires (**figure 46**), quasi-exclusives à ce stade. Leur interaction semble nécessaire pour orienter le fuseau mitotique (**figure 46**). Elles sont également impliquées dans la régulation de la prolifération précoce (**figure 41**).

Au stade tardif **P0**, SAPCD2 et LGN ont une localisation cellulaire complémentaire, avec un enrichissement à la membrane apicale et au cortex cellulaire latéral respectivement (**figure 46**), dans des proportions corrélées à celles des divisions planaires (**figure 26L et figure 28D**). SAPCD2 régule les divisions planaires symétriques terminales et la localisation cortico-latérale de LGN en mitose (**figure 46**), en agissant comme régulateur négatif de LGN (**figure 30**). LGN régule la production des divisions verticales asymétriques terminales, grâce à sa localisation cortico-apicale en l'absence de SAPCD2 (**figure 46**).

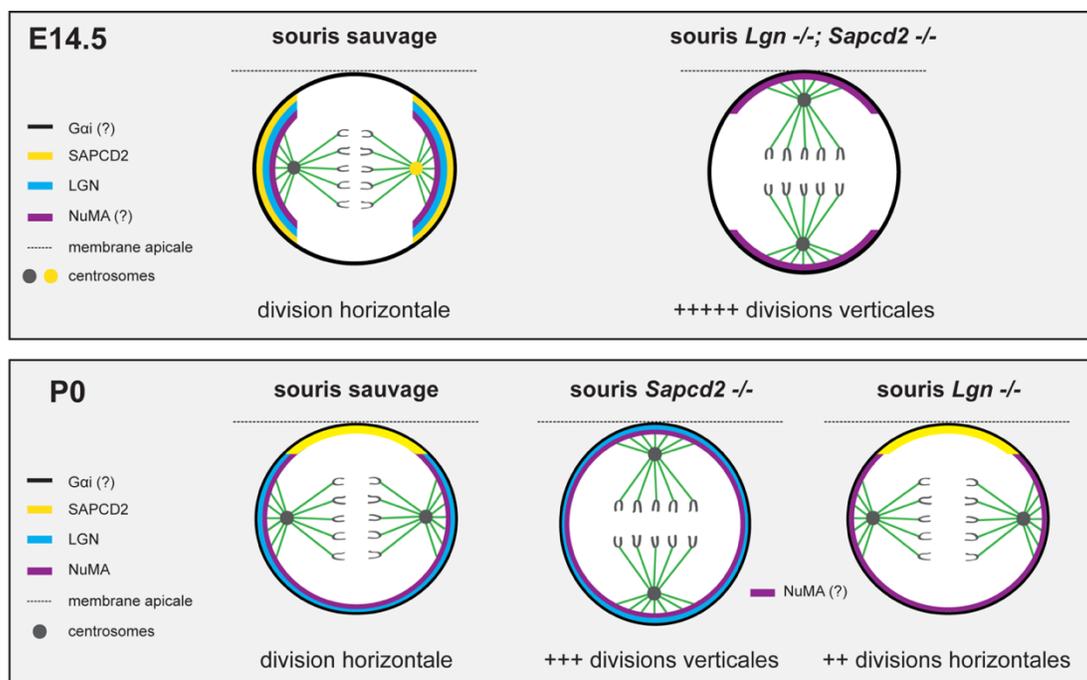


Figure 46. Modèle moléculaire de la régulation de l'orientation des progéniteurs au cours de la rétinogénèse, par SAPCD2 et LGN



(E14.5) Aux stades précoces de la rétino-genèse, SAPCD2 et LGN sont localisées aux pôles du fuseau mitotique dans les progéniteurs en division, conduisant aux divisions planaires quasi-exclusives à ce stade. SAPCD2 est également exprimée asymétriquement aux centrosomes. La localisation de Gai et NuMA reste à définir. Dans les souris doubles mutantes *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*, le nombre de divisions verticales augmentent drastiquement, jusqu'à 80% des divisions totales. **(P0)** Aux stades tardifs de la rétino-genèse, SAPCD2 et LGN ont une localisation complémentaire. SAPCD2 est exprimée à la membrane apicale, contraignant LGN et NuMA aux pôles du fuseau mitotique, ce qui engendre des divisions horizontales. En absence de *Sapcd2*, LGN est localisée tout autour du cortex, ce qui augmente le nombre de divisions verticales. En absence de *Lgn*, nous observons une augmentation des divisions horizontales.

En **conclusion**, nous avons découvert un nouvel acteur essentiel dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique des divisions cellulaires asymétriques dans la rétine et dans les cellules MDCK : SAPCD2 (**chapitre 2; (Chiu et al. 2016)**). Nous avons montré que le rôle de la protéine LGN est conservé dans les progéniteurs rétiniens à P0 (**figure 37; (Lacomme et al. 2016) en annexe 3**). SAPCD2 et LGN changent de rôles au cours du développement rétinien, et ont une expression dynamique au cours de la mitose (**figure 46**).

Nous avons également montré que SAPCD2 interagit avec des protéines clefs impliquées dans l'orientation du fuseau mitotique, dans la polarité cellulaire et/ou dans la formation des jonctions cellulaires ou encore dans la régulation du cycle cellulaire (**figure 25**).

Ces **découvertes** contribuent à mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contrôlent la taille du lignage neuronal et régulent la production de la diversité cellulaire au cours du développement du système nerveux central des vertébrés. SAPCD2 est surexprimée dans plusieurs cas de cancers (Xu et al. 2007, Cui et al. 2011, Jung et al. 2011, Zhang et al. 2012, Sun et al. 2013, Yuan et al. 2013, Mao et al. 2014, Wan et al. 2014, Weng et al. 2014), la description de son rôle dans les divisions cellulaires asymétriques permettra peut-être d'éclairer son implication dans les tumeurs cancéreuses humaines.



II. Comment les protéines SAPCD2 et LGN interagissent-elles ensemble ?

II. 1. Modèle du mécanisme d'action de SAPCD2 et LGN

Nous avons montré qu'à **P0**, SAPCD2 agit comme régulateur négatif de LGN et que leurs localisations cellulaires dans les progéniteurs en division sont exclusives. En absence de *Sapcd2*, LGN change de localisation et est exprimée tout autour du cortex cellulaire. Tandis qu'en absence de *Lgn* à P0 et E14.5, la localisation de SAPCD2 est inchangée, suggérant que SAPCD2 agit en amont de LGN.

À **E14.5**, SAPCD2 et LGN semblent être colocalisées aux pôles du fuseau mitotique, en prophase et métaphase, anaphase/télophase horizontales. Nous n'avons pas pu réaliser de marquage parce que les anticorps disponibles sont produits dans la même espèce animale. Ces résultats suggèrent que SAPCD2 **change de fonction** au cours du développement et interagit avec LGN différemment à E14.5 et P0. Nous faisons l'hypothèse qu'à E14.5, SAPCD2 n'agit pas comme régulateur négatif de LGN, et que leur fonction est redondante.

L'expérience idéale pour vérifier cette hypothèse serait de **suivre en temps réel** l'expression de SAPCD2 et LGN dans les progéniteurs rétiniens en division, comme proposé dans le chapitre précédent (page 134), et d'avoir une preuve directe du lien entre la localisation des protéines SAPCD2 et LGN en prophase, et l'orientation finale de la division cellulaire.

Il a été montré que les **ARNm** intracellulaires peuvent également jouer un rôle dans l'établissement de la polarité des cellules et influencer le devenir cellulaire, en agissant en parallèle de la protéine (Li *et al.* 1997, Broadus *et al.* 1998, Hughes *et al.* 2004, Medioni *et al.* 2012). L'expression de l'ARNm de SAPCD2 pourrait être analysée dans les progéniteurs en division, afin d'évaluer sa contribution relative à celle de la protéine. Comme la quantification de l'expression cortico-apicale de la protéine SAPCD2 en prophase (84.7%) correspond à la proportion de divisions horizontales (93%), nous supposons que l'ARNm de *Sapcd2* est localisé de la même façon que la protéine.



II. 2. Quelle est la nature de l'interaction entre SAPCD2 et LGN ?

L'implication de SAPCD2 dans la régulation de la localisation de LGN au cortex latéral de la cellule en division à P0, et peut-être à E14.5, nous amène à disséquer les domaines nécessaires à leur interaction *in vivo* dans la rétine. Nous avons montré que SAPCD2 et LGN ont une interaction directe dans des cellules HEK293T, *via* la région *N-terminus* de LGN. Comme SAPCD2 compétitionne avec NuMA pour se lier à LGN, nous avons proposé que SAPCD2 et LGN s'associent *via* les mêmes **domaines TPR** que la liaison LGN-NuMA, mais nous ne savons pas quel(s) domaine(s) de SAPCD2 sont requis pour cette liaison.

Nous faisons l'hypothèse qu'*in vivo*, leur **interaction est dynamique et transitoire** selon les stades de développement et la phase mitotique. Pour tester cette idée, nous pourrions confirmer leur interaction dans la rétine à différents stades et cartographier leurs domaines d'interaction, puis déterminer les liens entre la structure et la fonction de la protéine. Si comme attendu, l'interaction diffère selon le stade de développement, elle pourra être corrélée avec le patron d'expression dynamique de SAPCD2 et LGN enregistrée dans les progéniteurs rétinien en division (proposition page 134).

III. Mécanisme d'ancrage et de polarisation de SAPCD2 et LGN

III. 1. Qu'est-ce qui ancre et/ou polarise SAPCD2 au cortex cellulaire des divisions cellulaires horizontales ?

Nous avons montré que la liaison entre SAPCD2 et Gai est indirecte (**figure 25C**), suggérant que SAPCD2 est recrutée au cortex cellulaire par d'autres protéines, telles que celles retrouvées dans son **interactome (figure 25A)** ; comme les protéines de polarité et/ou impliquées dans la formation des jonctions cellulaires, comme **PARD3** (PAR3) et les protéines du complexe CRUMBS : *membrane palmitoylated protein 5 (MPP5)* ou PALS1; *multiple PDZ domain (MPDZ)* ou *multiple PDZ domain protein isoform 1 (MUPP1)* ; *InaD-like (INADL)* ou PATJ et **LIN7C** (Assemat *et al.* 2008) (**figure 47**). Ces complexes sont localisés au domaine apical, ils interagissent avec le complexe des jonctions apicales (AJC) pour établir et maintenir



la polarité apico-basale (Margolis et Borg 2005, Suzuki et Ohno 2006). L'AJC est composé des jonctions serrées et des jonctions adhérentes, il sépare le domaine apical du domaine baso-latéral des cellules épithéliales (Hartsock et Nelson 2008, Martin-Belmonte et Perez-Moreno 2011). Les jonctions adhérentes sont composées de plusieurs couches avec PAR3 et aPKC du côté le plus apical, plus bas les protéines *zona occludens 1* (ZO-1) et AFADIN, et enfin les protéines N-cadherin et β -catenin du côté le plus basal (Marthiens et ffrench-Constant 2009).

De par leur rôle, ces protéines pourraient recruter et/ou polariser SAPCD2 au cortex cellulaire. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions analyser l'expression de ces protéines dans la rétine, particulièrement dans les progéniteurs en mitose, confirmer l'interaction avec SAPCD2 dans la rétine et explorer les domaines d'interaction. Nous présumons que ces protéines agissent en amont de SAPCD2, et que leur localisation n'est pas modifiée en l'absence de *Sapcd2*, ce que nous pourrions vérifier dans les souris *Sapcd2* *-/-*.

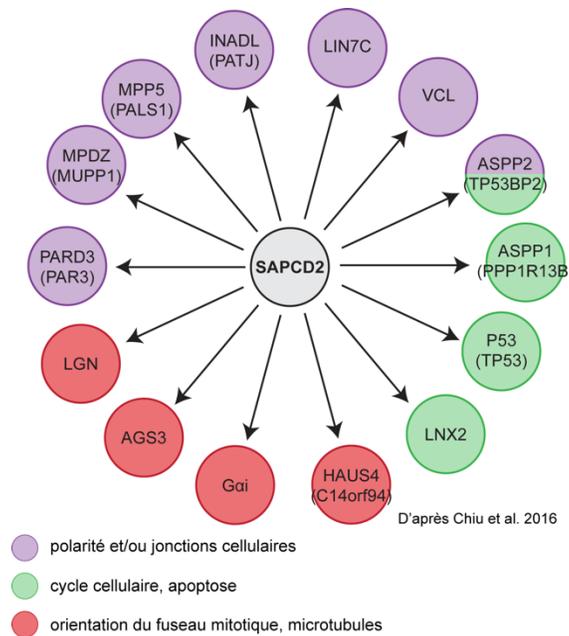


Figure 47. Protéines interagissant avec SAPCD2, identifiées dans notre crible protéomique (figure 25A)

Les protéines impliquées dans la polarité et/ou dans la formation et le maintien des jonctions cellulaires (violet) sont candidates pour l'ancrage et/ou la polarisation de SAPCD2 et/ou de LGN. Les protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire ou de l'apoptose (vert), sont candidates pour collaborer avec *Sapcd2* et *Lgn* dans la régulation de la prolifération, ou la dégradation de SAPCD2 au cours des phases tardives de la mitose. Les protéines impliquées dans l'orientation du fuseau mitotique (rouge) ont



permis de révéler le rôle de SAPCD2 dans la régulation de l'orientation des divisions cellulaires au cours de la rétino-genèse. La protéine HAUS4, associée à la régulation des microtubules est candidate pour l'interaction avec SAPCD2 dans les centrosomes. Modifié de (Chiu *et al.* 2016).

Le rôle de **PAR3** et **aPKC** dans la polarité apico-basale des progéniteurs suggère qu'elles pourraient être impliquées dans le recrutement et la polarisation de SAPCD2 au cortex apical. Nous avons montré que la localisation de PAR3 n'est pas modifiée en absence de *Sapcd2* (**figure 34D**), et nous ne nous attendons pas à ce qu'il y ait de changement non plus en absence de *Lgn*, ce que nous pourrions vérifier dans les souris mutantes *Lgn* *-/-*.

Les protéines du complexe de polarité **CRUMB**, MPP5 (PALS1), MPDZ (MUPP1) et INADL (PATJ), retrouvées dans l'interactome de SAPCD2 (**figure 47**), sont exprimées dans la rétine (van Rossum *et al.* 2006, Gosens *et al.* 2008). Identifié dans l'épithélium de *Drosophila*, ce complexe joue un rôle crucial dans la mise en place de la membrane apicale des cellules épithéliales (Tepass *et al.* 1990). Sa surexpression augmente la surface de la membrane apicale et crée un épithélium multicouche (Wodarz *et al.* 1995, Klebes et Knust 2000). Le rôle de ces protéines dans l'établissement de la polarité suggère que le recrutement et la polarisation apicale de SAPCD2 pourraient dépendre de ces protéines.

Leur mutation cause des dégénérescences rétinienne (den Hollander *et al.* 2001, Bulgakova et Knust 2009, Cho *et al.* 2012). La mutation de MPDZ (MUPP1) engendre une perturbation de la circulation du fluide cérébrospinal avec une accumulation du liquide et une augmentation du volume des ventricules, comme ce que l'on observe dans la souris double mutante adulte *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*.

La protéine CRB chez la *Drosophila* a trois homologues mammifères : CRB1, CRB2 et CRB3 (den Hollander *et al.* 1999, Lemmers *et al.* 2002, Makarova *et al.* 2003, van den Hurk *et al.* 2005). CRB1 et CRB3 sont principalement exprimées dans le cerveau et la rétine (den Hollander *et al.* 2002). Elles ne sont pas retrouvées dans l'interactome de SAPCD2 (**figure 25A**), mais dans la rétine, CRB1 colocalise et interagit avec la protéine **MPP5** (PALS1) aux jonctions adhérentes (Roh *et al.* 2002), homologue vertébré de la protéine *stardust* (SDT) chez la *Drosophila*, qui est retrouvée dans l'interactome de SAPCD2 (**figure 47**). De la famille *membrane-associated guanylate kinase* (MAGUK), MPP5 (PALS1) a de nombreux domaines



d'interactions protéine-protéine et permet de recruter des protéines à la membrane apicale pour établir la polarité des cellules épithéliales (Kamberov *et al.* 2000, Straight *et al.* 2001, Roh *et al.* 2003, Straight *et al.* 2004).

La troisième protéine du complexe CRUMB, PATJ chez la *Drosophila*, a deux homologues mammifères avec des domaines PDZ, **INADL** (PATJ) et **MPDZ** (MUPP1) localisées aux jonctions serrées (Hamazaki *et al.* 2002). MPP5 (PALS1) recrute INADL (PATJ) au cortex apical, elles se stabilisent l'une l'autre (Roh *et al.* 2002, Straight *et al.* 2004, Michel *et al.* 2005). INADL (PATJ) stabilise les jonctions serrées, sa diminution ou sa surexpression dans des cellules épithéliales modifie la localisation des protéines ZO1, ZO3, CRB3 et MPP5 (PALS1) (Lemmers *et al.* 2002, Michel *et al.* 2005, Shin *et al.* 2005).

LIN7C fait également partie du complexe de polarité CRUMB, c'est un des homologues vertébrés de la protéine LIN7 chez la *Drosophila*. Aussi appelée *mammalian lin-seven protein 3* (MALS3) et *vertebrate lin-seven homolog 3* (VELI3), elle est exprimée dans la rétine en développement et adulte (Stohr *et al.* 2005, Wei *et al.* 2006, Luz et Knust 2013). C'est une protéine aux domaines PDZ et L27, qui interagit avec MPP5 (PALS1) et est décrite comme participant potentiellement à l'organisation de jonctions intercellulaires dans la rétine (Stohr *et al.* 2005). Elle forme également un complexe avec MPP7 et DLG1 pour stabiliser et localiser DLG1 aux jonctions cellulaires (Bohl *et al.* 2007). Or comme discuté plus haut, DLG1 est impliquée dans le recrutement cortico-latéral de LGN et dans l'orientation du fuseau mitotique des progéniteurs neuraxiaux chez le poulet (Saadaoui *et al.* 2014). De plus, il est montré que LIN7C est requise pour le maintien de la polarité apico-basale des progéniteurs neuronaux (Srinivasan *et al.* 2008). Elle n'est pas seulement exprimée aux jonctions mais sur toute la surface apicale des progéniteurs lors de la neurogenèse (Srinivasan *et al.* 2008), et est nécessaire au maintien de la localisation apicale de INADL (PATJ) et MPP5 (PALS1), mais pas à leur polarisation initiale (Srinivasan *et al.* 2008). Nous faisons donc l'hypothèse que INADL (PATJ) et MPP5 (PALS1) sont nécessaires à la polarisation de SAPCD2, et que LIN7C est nécessaire à son maintien dans les progéniteurs s'appêtant à se diviser à l'horizontale.



D'après notre interactome, SAPCD2 interagit avec les protéines *tumor protein p53 binding protein 2* (TP53BP2), aussi appelée *apoptosis-stimulating protein of p53 2* (**ASPP2**), et *protein phosphatase 1 regulatory subunit 13B* (PPP1R13B) ou *apoptosis-stimulating protein of p53 1* (ASPP1) (**figure 47**). Ces deux protéines au domaine SH3 sont exprimées dans la rétine et dans le cerveau, et régulent plusieurs voies de signalisation différentes (Sottocornola *et al.* 2010, Wilson *et al.* 2013). D'une part elles stimulent l'apoptose *via* la protéine proapoptotique P53 et ont un rôle de tumo-suppresseurs (Vives *et al.* 2006, Wilson *et al.* 2013), et d'autre part ASPP2 contrôle la polarité cellulaire et la prolifération des progéniteurs neuraux au cours du développement du système nerveux central (Sottocornola *et al.* 2010). ASPP2 est un régulateur de PAR3, nécessaire à sa localisation cellulaire apicale et aux jonctions. Leur localisation aux jonctions est interdépendante. ASPP2 est également nécessaire à la formation de l'AJC et au maintien de l'intégrité des jonctions et du domaine apical (Cong *et al.* 2010, Sottocornola *et al.* 2010). La liaison de PAR3 avec ASPP2 a lieu avant celle de PAR3 avec PAR6 et aPKC (Cong *et al.* 2010). Il est probable que le recrutement et la polarisation de SAPCD2 passe par son interaction avec ASPP2.

Basés sur les similitudes de mécanisme d'action dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique de SAPCD2 dans la rétine et la protéine *abnormal spindle-like microcephaly associated protein* (**ASPM**), ou *microcephaly 5* (MCPH5), dans le cortex cérébral, nous proposons qu'ASPM conserve son rôle dans la rétine et qu'elle régule négativement SAPCD2 aux pôles du fuseau mitotique, ce qui permettrait sa polarisation au cortex cellulaire apical. ASPM n'est pas retrouvée dans l'interactome (**figure 25A**), mais elle est exprimée dans la rétine de poisson-zèbre (Novorol *et al.* 2013) et conservée chez la souris. Comme SAPCD2, elle est exprimée dans de nombreux tissus embryonnaires (Bond *et al.* 2002, Luers *et al.* 2002) et surexprimée dans des cas de cancers (Kouprina *et al.* 2005). ASPM et son homologue *abnormal spindle* (Asp) chez la *Drosophile* sont associés à la terminaison (-) des microtubules et aux centrosomes (Saunders *et al.* 1997, do Carmo Avides et Glover 1999, Wakefield *et al.* 2001). Elles contrôlent l'organisation des microtubules astraux et régulent la position du fuseau mitotique (Kouprina *et al.* 2005, Zhong *et al.* 2005, Fish *et al.* 2006, Gai *et al.* 2016). En mitose, ASPM est localisée aux pôles du fuseau mitotique et est nécessaire à l'orientation planaire des



divisions neuroépithéliales précoces, qui assurent l'augmentation du nombre de progéniteurs, de neurones et de la taille du cerveau (Bond *et al.* 2002, Kouprina *et al.* 2005, Ponting et Jackson 2005, Zhong *et al.* 2005, Fish *et al.* 2006). ASPM régule l'orientation du fuseau mitotique en perturbant la dynamique des microtubules astraux (Gai *et al.* 2016).

III. 2. À P0, comment LGN est-elle polarisée à la membrane apicale pour conduire à des divisions verticales ?

Nous pensons que la polarisation de LGN pourrait être un **phénomène passif**, et que grâce à l'absence de SAPCD2 dans la proportion de prophases correspondant au nombre de divisions verticales, LGN est localisée à la membrane apicale, engendrant ainsi les divisions verticales. D'après la définition de la randomisation de l'orientation des divisions cellulaires, de Jüschke *et al.* (Juschke *et al.* 2014), la distribution des angles observée dans les souris mutantes *Sapcd2* *-/-* avec 25% de divisions verticales, 15% obliques et 60% d'horizontales (Chiu *et al.* 2016) (**figure 28D**), est considérée comme randomisée. De façon aléatoire, LGN serait localisée à la membrane apicale dans 25% des prophases, conduisant à des divisions verticales.

L'hypothèse alternative serait un processus actif pour recruter LGN au cortex cellulaire apical, qui pourrait être le mécanisme mettant en jeu la protéine **mINSC**, l'un des régulateurs clefs de l'orientation des divisions verticales et interacteur de LGN (Lechler et Fuchs 2005, Zigman *et al.* 2005, Postiglione *et al.* 2011). mINSC est exprimée dans la rétine embryonnaire et spécifiquement localisée au cortex apical des progéniteurs rétiniens qui se divisent à la verticale, et aux pôles du fuseau mitotique en plus de la membrane apicale dans les progéniteurs qui se divisent à l'horizontale, aux stades tardifs de la rétinogenèse (Zigman *et al.* 2005).

Une diminution de mINSC dans la rétine réduit le nombre de divisions verticales, à l'instar de l'augmentation des divisions symétriques horizontales, ce qui phénotype les rétines de souris mutantes pour *Lgn* (Zigman *et al.* 2005). De plus, mINSC semble réguler positivement LGN dans la rétine (Zigman *et al.* 2005), tandis que SAPCD2 est un régulateur négatif. Nous pourrions donc tester si SAPCD2 et mINSC compétitionnent pour se lier à LGN et/ou pour se localiser à la membrane apicale, comme nous l'avons fait pour NuMA (**figure 25E**). Nous pourrions explorer le mécanisme de liaison entre mINSC, LGN et NuMA dans la rétine.



III. 3. Comment SAPCD2 est-elle désactivée dans les divisions verticales ?

mINSC est localisée au cortex apical des progéniteurs rétiniens se divisant à la verticale (Zigman *et al.* 2005), à l'inverse de SAPCD2 qui est absent de ces divisions. mINSC pourrait être un régulateur négatif de SAPCD2 dans les progéniteurs rétiniens en prophase s'appêtant à se diviser à la verticale. Nous faisons l'hypothèse que quand mINSC est localisée à la membrane apicale, SAPCD2 en soit exclue, ce qui conduirait à la localisation cortico-apicale LGN et à des divisions asymétriques verticales. Nous pourrions vérifier si mINSC et SAPCD2 interagissent dans la rétine, ainsi que leur expression supposée exclusive dans des progéniteurs rétiniens en division.

mINSC n'est pas retrouvée dans l'interactome de SAPCD2 (**figure 25A**), cependant elle n'est peut-être pas exprimée dans les cellules HEK293T, avec lesquelles l'interactome a été réalisé. Et si leur expression est transitoire et exclusive, il se peut que cette technique ne soit pas assez précise pour détecter ce type d'interactions.

III. 4. À P0, comment SAPCD2 est-elle désactivée dans les phases tardives de la mitose horizontale ?

Il a été montré et nous avons confirmé que l'expression de SAPCD2 dépend des phases du cycle cellulaire (Mao *et al.* 2014) (**figure 26A**). Or plusieurs protéines dont l'expression dépend du cycle cellulaire sont dégradées par la voie ubiquitine-protéasome au cours du cycle cellulaire (Mao *et al.* 2014), et nous avons trouvé la protéine **LNx2** (*ligand of NUMB protein X 2*), une ubiquitine ligase E3, dans l'interactome de SAPCD2 (**figure 47**). LNx2 est fortement exprimée dans la rétine (www.genecards.org), suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans la dégradation de SAPCD2.

Si les niveaux d'ARNm varient comme ceux de la protéine, d'autres mécanismes de désactivation périodique sont possibles comme la régulation transcriptionnelle, ou l'inactivation par miARNs. Dans le cancer gastrique chez l'humain, il a été montré que le miARN miR-29a, réprime l'expression de la protéine et de l'ARN Sapcd2 (Cui *et al.* 2011).



III. 5. Comment SAPCD2 exclut-elle LGN de la membrane apicale pour conduire à des divisions planaires ?

Nous avons montré que la surexpression de SAPCD2 dans des cellules HeLa délocalise LGN du cortex cellulaire (**figure 30A**). De la même façon dans l'épiderme de souris, la perte d'un composant des jonctions adhérentes, α -catenin, engendre la perte de LGN au cortex de la cellule et la polarisation aléatoire de NuMA (Lechler et Fuchs 2005). Des défauts de la F-actine engendrent également la perte de LGN au cortex cellulaire (Kaushik *et al.* 2003). Or, nous avons montré que SAPCD2 interagit avec des protéines impliquées dans la formation des **jonctions** cellulaires et/ou du **cytosquelette**, comme la **vinculin** (VCL) (**figure 47**), impliquée dans la liaison des molécules d'adhésion intégrines au cytosquelette d'actine. Nous pourrions tester si la localisation corticale de SAPCD2 modifie la conformation de l'actine et/ou la composition du cytosquelette, qui empêcherait l'association de LGN au cortex cellulaire. Nous pourrions d'abord vérifier si VCL est exprimée dans la rétine, et analyser sa localisation cellulaire dans les progéniteurs en division en absence et en présence de *Sapcd2*.

Un autre mécanisme possiblement conservé dans le neuroépithélium rétinien, passerait par la protéine du complexe de polarité **aPKC**. Dans les neuroblastes de *Drosophile*, aPKC fait partie du complexe apical de recrutement de PINS (Izumi *et al.* 2004). À l'inverse, dans les cellules MDCK, aPKC phosphoryle LGN, ce qui inhibe sa localisation apicale et favorise sa distribution latérale (Hao *et al.* 2010, Zheng *et al.* 2010). La phosphorylation de LGN par aPKC augmente l'affinité de LGN pour la protéine **14-3-3**, aussi nommée PAR5, qui compétitionne avec Gai au domaine apical, pour empêcher la liaison entre LGN et Gai, et la localisation apicale de LGN (Hao *et al.* 2010). En d'autres termes, aPKC régule l'exclusion de LGN au cortex apical, *via* 14-3-3. Ainsi les microtubules s'attachent à LGN au cortex latéral pour orienter le fuseau mitotique des cellules MDCK dans le plan de l'épithélium.

Est-ce que ce mécanisme entre en jeu dans les divisions planaires des rétines de souris, en complément de l'action de SAPCD2 ? Quand *Sapcd2* est absent, LGN envahit le cortex cellulaire apical, ce qui conduit aux divisions verticales. Si le mécanisme par aPKC a lieu dans la rétine, est-il désactivé dans les divisions verticales, pour que LGN puisse être localisée au cortex apical ? Dans ce cas nous pouvons imaginer, que comme SAPCD2, aPKC n'est pas



localisée au cortex apical des prophases qui vont se diviser à la verticale, ce que nous pourrions vérifier par l'analyse de la localisation cellulaire de aPKC selon les phases mitotiques. Nous pourrions faire l'hypothèse qu'aPKC permette de recruter et/ou de polariser SAPCD2 au cortex apical, et d'exclure LGN du cortex apical *via* 14-3-3.

Pour tester cette possibilité, nous pouvons étudier l'expression de 14-3-3 dans la rétine, et plus spécifiquement dans les progéniteurs en division. Nous pourrions définir si SAPCD2 et aPKC interagissent et étudier la localisation cellulaire de SAPCD2 en présence et en absence de aPKC. Nous présumons que aPKC agit en amont de SAPCD2, ce que nous pourrions vérifier dans les souris mutantes *Sapcd2* *-/-*.

Il est intéressant de noter qu'une étude chez l'humain a montré l'interaction entre la protéine 14-3-3 et la protéine transmembranaire **TMEM102** (*transmembrane protein 102*), aussi appelée CBAP (*common β -chain associated protein*) (Jin *et al.* 2004), retrouvée dans l'interactome de SAPCD2 (**figure 25A**). Il est possible que SAPCD2 colocalise avec TMEM102 au cortex apical des progéniteurs rétinien en division, et que TMEM102 recrute 14-3-3 au cortex apical en parallèle de la phosphorylation de LGN par aPKC, pour exclure LGN du domaine apical.

III. 6. Comment LGN est-elle polarisée aux pôles du fuseau mitotique, en absence de *Sapcd2*, conduisant à des divisions horizontales ?

Nous avons montré que SAPCD2 agit comme régulateur négatif de LGN (**figure 30**), et le contraint à une localisation cortico-latérale (**figure 30H-I**). Or dans le mutant *Sapcd2* *-/-*, nous observons certes une importante augmentation des divisions verticales, mais il reste une majorité de divisions horizontales. Quel(s) autre(s) mécanisme(s) entre(nt) en jeu pour réguler ces divisions planaires en absence de *Sapcd2* ?

Nous faisons l'hypothèse que la régulation de l'orientation planaire de ces divisions cellulaires passe par LGN, et que le rôle de la protéine NuMA est conservé dans la rétine. Nous proposons deux mécanismes alternatifs à SAPCD2, possiblement conservés dans la rétine. Comme vu en introduction, la protéine **DLG/DLG1** est polarisée au cortex cellulaire pendant



la mitose, et essentielle au recrutement cortico-latéral de LGN et à l'orientation du fuseau mitotique dans différents contextes cellulaires, comme dans les divisions planaires des progéniteurs neuraux de poulet (Saadaoui *et al.* 2014). En absence de DLG, LGN se situe tout autour du cortex cellulaire dans l'épithélium de *Drosophile* (Bergstralh *et al.* 2013), tout comme en l'absence de *Sapcd2*. Nous suggérons que DLG1 permet l'ancrage cortico-latéral de LGN même en l'absence de SAPCD2. Nous pourrions étudier l'expression de DLG1 dans la rétine, et en particulier dans les progéniteurs rétinien en division, en présence et en absence de *Sapcd2*.

Le deuxième mécanisme proposé est *via* la protéine **AFADIN**. Comme vu en introduction, cette protéine est impliquée dans l'orientation du fuseau mitotique et dans la localisation de LGN aux pôles du fuseau mitotique des neuroblastes et des progéniteurs de muscles chez la *Drosophile*, ainsi que dans des cellules épithéliales humaines (Speicher *et al.* 2008, Wee *et al.* 2011, Carminati *et al.* 2016). Elle est exprimée dans la rétine et le cerveau (www.genecards.org). Elle interagit avec ZO-1 et occludin, et est impliquée dans l'organisation des jonctions serrées et/ou adhérentes en connectant nectine à l'actine (Takai et Nakanishi 2003). Plusieurs similitudes sont à noter entre SAPCD2 et AFADIN. Les deux compétitionnent avec NuMA pour se lier à LGN *via* ses domaines TPR. Si AFADIN est localisée dans les progéniteurs rétinien comme chez la *Drosophile*, soit aux pôles du fuseau mitotique, nous pourrions suggérer qu'à E14.5, SAPCD2 et AFADIN aient un rôle redondant, potentiellement dans le recrutement cortico-latéral de LGN; tandis qu'à P0, leur localisation serait complémentaire, AFADIN recruterait LGN aux pôles du fuseau mitotique, au cortex cellulaire latéral. Nous pourrions vérifier l'expression d'AFADIN dans la rétine, et en particulier dans les progéniteurs rétinien en division, en présence et en absence de *Sapcd2*, ainsi que leur interaction.

Cependant à P0, dans les souris mutantes *Lgn* *-/-*, les divisions horizontales augmentent vers une quasi-exclusivité, suggérant qu'il existe un mécanisme parallèle à celui passant par LGN pour réguler l'orientation du fuseau mitotique, ou bien que les divisions horizontales résultent d'un processus passif dans les stades tardifs de la rétinogenèse.



IV. Expression spatio-temporelle de la protéine NuMA et son interaction avec SAPCD2 et LGN dans les progéniteurs rétiniens

IV. 1. Rôle de NuMA dans les progéniteurs rétiniens en division

Comme vu en introduction, **NuMA** fait partie du complexe protéique de régulation de l'orientation du fuseau mitotique avec *Gai* et *LGN*. *LGN* recrute *NuMA* au cortex cellulaire, qui ancre les microtubules astraux et oriente le fuseau mitotique (Bowman *et al.* 2006, Siller *et al.* 2006, Peyre *et al.* 2011) (**figure 8**). Même si le mécanisme de liaison entre *PINS* et *MUD* est conservé de la *Drosophila* au cortex cérébral de souris et de poulet; l'association entre *LGN* et *NuMA* dans les progéniteurs rétiniens reste à confirmer, ainsi que la conservation de l'association entre *NuMA* et le complexe dynéine-dynactine sur les microtubules astraux.

Dans les prophases à **P0**, nous avons montré que l'expression de *NuMA* corrèle avec celle de *LGN* (**figure 26M et 26R; figure 46**), suggérant une colocalisation. Nous ne pouvons pas réaliser de co-marquage parce que les anticorps disponibles sont produits dans la même espèce animale. Nous suggérons que la liaison *LGN*-*NuMA* est conservée dans les progéniteurs rétiniens en division à **P0**, conduisant à des divisions horizontales, et que la localisation corticale de *NuMA* dépend de *LGN* (**figure 46**). Dans les prophases où *LGN* est localisée à la membrane apicale et latérale, en absence de *Sapcd2*, nous supposons également que *LGN* recrute *NuMA* au cortex cellulaire apical, et qu'elles conduisent ainsi à une division verticale (**figure 46**). En absence de *Sapcd2*, nous anticipons que *NuMA* est localisée tout autour du cortex cellulaire comme *LGN* (**figure 46**). Pour tester ces hypothèses, nous pourrions analyser l'expression de *NuMA* dans les différentes phases mitotiques, et nous assurer de la redondance du patron d'expression avec *LGN*. Nous anticipons que la localisation de *NuMA* est **dynamique**, comme celle de *LGN*, dans les différentes phases mitotiques.



IV. 2. Quel est le mécanisme mis en jeu en absence de *Lgn* pour réguler l'orientation des divisions des progéniteurs rétiniens, NuMA est-elle localisée et polarisée au cortex cellulaire en absence de *Lgn* ?

L'étude de Marine Lacomme, post-doctorante dans le laboratoire, a montré qu'en absence de *Lgn* dans la rétine à P0, les divisions horizontales augmentent (**figure 37; figure 46; annexe 3**). Mais quels sont les mécanismes moléculaires de cette orientation planaire ? Nous supposons que NuMA est recrutée et polarisée au cortex latéral par un autre mécanisme que celui *via* LGN. Est-ce un mécanisme qui serait présent seulement en absence de *Lgn*, comme un mécanisme de réparation ? En observant l'expression de NuMA dans des progéniteurs rétiniens en division dans des souris *Lgn* *-/-*, nous saurions si la protéine est polarisée au cortex latéral dans les divisions horizontales en l'absence de *Lgn*.

Si SAPCD2 est nécessaire à l'**ancrage de NuMA** au cortex cellulaire, nous nous attendons à ce que NuMA soit absente du cortex cellulaire en absence de SAPCD2. Pour le vérifier, nous pourrions observer l'expression corticale de NuMA dans des progéniteurs rétiniens en division dans les souris *Sapcd2* *-/-*. Si sa localisation corticale est altérée, est-ce que son expression au fuseau mitotique et aux centrosomes sera maintenue ?

Est-ce que SAPCD2 favorise la **polarisation de NuMA** au cortex latéral à P0 ? Si tel est le cas, même sans *Lgn*, NuMA serait polarisée au cortex latéral des progéniteurs en prophase en présence de SAPCD2 à la membrane apicale, et tout autour du cortex cellulaire en absence de SAPCD2.

En l'absence de *Sapcd2*, *Lgn* ou les deux, à E14.5 dans la rétine, nous avons montré une augmentation drastique des divisions verticales (**figure 39**). Quels sont les mécanismes moléculaires régulant l'orientation des 80% de divisions apico-basales dans la souris double mutante *Lgn;Sapcd2* ? Nous supposons que les progéniteurs rétiniens ont perdu le mécanisme pour ancrer NuMA au cortex latéral, ou que d'autres protéines que LGN peuvent recruter et polariser NuMA au cortex cellulaire apical, comme proposé ci-dessus. Il est également possible que les divisions verticales résultent d'un **processus passif** comme suggéré dans le cortex



cérébral (Lancaster et Knoblich 2012). Ce processus inhiberait le mécanisme de régulation de l'orientation, contrairement aux divisions horizontales qui seraient le fruit d'un processus actif

Il est important de noter qu'il reste environ 20% de divisions horizontales dans les souris doubles mutantes *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-* à E14.5 (**figure 39**), suggérant l'implication d'autres mécanismes de régulation de ces divisions, indépendants de LGN et SAPCD2. Dans les progéniteurs de l'épiderme de souris, il a été montré qu'en absence de LGN au cortex cellulaire, NuMA est polarisée de façon aléatoire (Lechler et Fuchs 2005), engendrant une randomisation de l'orientation du fuseau mitotique. Comme proposé précédemment, peut-être qu'à E14.5 dans la rétine, les divisions cellulaires se font par défaut verticalement, et NuMA est polarisée au cortex latéral de 20% des divisions cellulaires. Une autre hypothèse est proposée pour réguler l'orientation planaire des progéniteurs épithéliaux : la liaison de la dynéine à la β -caténine dans les **jonctions** adhérentes subapicales, qui séparent le domaine apical de la région apico-basale et qui permet l'ancrage des microtubules aux jonctions adhérentes (Ligon *et al.* 2001). Nous pourrions observer si ce mécanisme est conservé dans la rétine.

V. Rôle potentiel de SAPCD2 dans les centrosomes

À E14.5, SAPCD2 semble exprimée dans un des deux centrosomes, en plus de sa localisation corticale (**figure 38F**; **figure 46**). Plusieurs autres indices suggèrent un rôle de SAPCD2 dans les centrosomes. La protéine centrosomale **CENP-E** (*centromere-associated protein E*), une kinésine mitotique qui favorise l'élongation des terminaisons (+) des microtubules (Sardar *et al.* 2010), fait partie du réseau de régulation de SAPCD2 (Zhang *et al.* 2012). Chez l'humain, des analyses bio-informatiques montrent un lien entre la protéine SAPCD2 et la protéine centrosomale **CEP350** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/89958>), requise pour l'ancrage des microtubules aux centrosomes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9857>). De plus, dans l'interactome de SAPCD2, nous avons trouvé la protéine **HAUS4** (*HAUS augmin like complex subunit 4*), aussi appelée C4orf94 (**figure 47**), impliquée dans l'assemblage des microtubules du fuseau mitotique.



Des perturbations de l'orientation planaire, comme celles observées dans la rétine de souris *Sapcd2* *-/-* (**figure 28**), sont également décrites dans des cas de mutations de protéines associées aux centrosomes comme ASPM, CDK5RAP2 et CENP-J (*centromere-associated protein J*), ou de la protéine DCLK (*doublecortin-like kinase*) associée aux microtubules (Bond *et al.* 2005, Shu *et al.* 2006, Barrera *et al.* 2010). Nous faisons l'hypothèse, qu'en plus de son association avec LGN, SAPCD2 régule l'orientation du fuseau mitotique des progéniteurs rétiniens précoces par un **mécanisme centrosomal**, ou en perturbant la dynamique des microtubules, comme le fait ASPM (page 161).

De plus, les **centrosomes** ont été caractérisés comme étant asymétriquement hérités entre les deux cellules filles et pouvant **influencer le destin cellulaire** (Rebollo *et al.* 2007, Yamashita *et al.* 2007, Januschke et Gonzalez 2010, Conduit *et al.* 2015). Nous pourrions analyser l'asymétrie des centrosomes des progéniteurs rétiniens précoces en division en l'absence de *Sapcd2* et/ou *Lgn*, comme cela a été fait dans les progéniteurs corticaux (Wang *et al.* 2009). Les centrosomes se dupliquent avant la mitose, les deux centrioles qui les composent se séparent entre les deux cellules filles et servent de modèle pour former un deuxième centriole "fille". Le nouveau centrosome est alors composé du centriole "mère" plus âgé, et du centriole "fille". Le cycle se répète et lors de la prochaine mitose, une des cellules filles va hériter du centriole plus âgé et l'autre du centriole plus jeune (Hotz *et al.* 2012). L'héritage des centrosomes influence le destin cellulaire : dans les progéniteurs neuraux, les futurs neurones héritent du centrosome fille, tandis que la cellule proliférative hérite du centrosome mère (Wang *et al.* 2009); c'est l'inverse dans les neuroblastes de *Drosophila* (Conduit et Raff 2010, Januschke *et al.* 2011, Conduit *et al.* 2014). Une mutation ou une altération de protéines associées aux centrosomes pourrait altérer leur distribution asymétrique, importante dans la neurogenèse corticale (Wang *et al.* 2009).

Aux stades tardifs de la rétino-genèse, la corrélation entre l'orientation et le devenir asymétrique de la division cellulaire a été démontrée par imagerie en temps réel de la division et des cellules filles (Cayouette 2003, Zigman *et al.* 2005) (**figure 21**), et expliquée par l'asymétrie d'héritage du déterminant cellulaire NUMB, antagoniste de Notch (Cayouette *et al.*



2001, Kechad *et al.* 2012). Nous pourrions vérifier l'héritage de NUMB aux stades prolifératifs de la rétino-genèse. De plus, si la corrélation entre l'orientation et le devenir asymétrique de la division est démontrée à ce stade, d'autres déterminants cellulaires intrinsèques, comme les centrosomes, pourraient influencer le devenir asymétrique de la division précoce et dépendre de SAPCD2.

VI. Comment SAPCD2 et LGN régulent-t-elles la prolifération cellulaire, les mitoses non apicales et la localisation ectopique de certaines cellules ?

Rappelons que la localisation dynamique de SAPCD2 au cours de la rétino-genèse suggère que la protéine changerait de rôle au cours du développement. Ses différents rôles pourraient être conférés par l'**isoforme** de la protéine SAPCD2 que nous détectons par *western blot* (**figure 26B**).

Dans la rétine de souris *Sapcd2* *-/-*, et non dans les souris *Lgn* *-/-*, nous observons une mauvaise localisation de cellules bipolaires et photoréceptrices (**figure 40C-D**), ainsi que quelques mitoses non apicales (**figure 41E**). Le phénotype est fortement amplifié dans les rétines de souris doubles mutantes *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*, avec une couche neuronale surnuméraire (**figure 40E à 40L**) et de nombreuses mitoses non apicales (**figure 41G-H**). Nous ne savons pas quand ces neurones sont formés, mais la réorientation précoce drastique du fuseau mitotique suggère qu'elle pourrait être la cause de cette prolifération précoce et de la délocalisation des neurones.

Plusieurs explications sont envisageables. Premièrement, il est possible que les cellules issues des divisions du **progéniteur basal**, proposé hyperprolifératif, engendrent des cellules ectopiques et des mitoses non apicales. Mais comme nous observons une augmentation des divisions verticales à E14.5 dans les rétines de souris *Lgn* *-/-*, sans pour autant observer de mitoses non apicales et de neurones délocalisés, cette première hypothèse peut-être en partie invalidée.



Deuxièmement, *Sapcd2* et/ou *Lgn* pourraient être impliqués dans la **migration intercinétique des noyaux** (INM) des progéniteurs rétiniens, que nous pourrions étudier dans les souris simples et doubles mutantes. La protéine ASPP2, identifiée dans l'interactome de SAPCD2 (**figure 47**) et décrite précédemment (page 161), influence l'INM et la lamination pendant la neurogenèse (Sottocornola *et al.* 2010). Les souris mutantes pour *Aspp2* présentent une hydrocéphalie et des défauts dans la rétine, dus à un défaut de localisation de PAR3, entraînant la perte d'intégrité des jonctions adhérentes et serrées, et une augmentation du nombre de progéniteurs neuraux (Sottocornola *et al.* 2010).

Troisièmement, *Sapcd2* et/ou *Lgn* pourraient être impliqués dans la **migration des cellules postmitotiques**. Un défaut dans les jonctions cellulaires peut causer une délocalisation des cellules. L'orientation du fuseau mitotique influence l'héritage des jonctions adhérentes, et permet l'héritage asymétrique de PAR3-aPKC, tout en conservant l'ancrage des deux cellules filles à la membrane apicale du neuroépithélium par les protéines de jonctions (Bultje *et al.* 2009, Marthiens et ffrench-Constant 2009). SAPCD2 interagissant avec de nombreuses protéines impliquées dans la formation et le maintien des jonctions cellulaires (**figure 47**), il se pourrait qu'en son absence, la composition de certaines jonctions soit altérée, ce qui délocaliserait des cellules. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions vérifier l'intégrité des jonctions cellulaires en absence de *Sapcd2* et/ou *Lgn* dans la rétine. Le phénotype de mitoses non apicales est aussi observé en cas de mutation de protéines centrosomales (Novorol *et al.* 2013), ainsi que dans le cortex cérébral d'une autre lignée de souris mutante pour *Lgn* (Konno *et al.* 2008). Dans ces souris en l'absence de *Lgn*, le fuseau mitotique des progéniteurs neuraux se randomise et certaines cellules filles deviennent non apicales parce qu'elles ont perdu leur complexe de jonctions (Konno *et al.* 2008).

Quatrièmement, il est possible que la **densité cellulaire** des couches neuronales appropriées soit maximale, et force la production des cellules surnuméraires à une autre position.

Enfin peut-être que l'absence de *Sapcd2* engendre des **défauts d'apoptose** qui empêcherait l'élimination des cellules surnuméraires à temps. Dans la rétine, l'apoptose a lieu principalement au cours des deux premières semaines postnatales, en suivant le même ordre chronologique que la formation des cellules (Young 1984). Les cellules surnuméraires ou qui présentent des défauts de connections sont éliminées par apoptose, soit parfois environ 50% de



la population de certains types cellulaires (Vecino *et al.* 2004). Aux vues des neurones rétiniens surnuméraires dans le mutant *Sapcd2* *-/-* et dans le double mutant *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*, mais non en l'absence de *Lgn* seul, nous pourrions postuler que l'absence de *Sapcd2* cause des défauts d'apoptose. Nous pourrions l'étudier dans les souris simples et doubles mutantes. De plus, nous avons trouvé dans l'interactome de SAPCD2 des protéines impliquées dans l'apoptose comme ASPP2, ASPP1 et P53 (**figure 47**).

VII. Est-ce que le rôle de SAPCD2 dans la régulation de l'orientation de la division cellulaire est conservé dans l'épiderme et le neuroépithélium de *Drosophile* et vertébrés ?

VII. 1. *Sapcd2* chez la *Drosophile*

L'homologue de *Sapcd2* chez la mouche est **CG3880**. Avant même de commencer l'étude de SAPCD2 chez la souris, des collaborateurs ont étudié l'absence et la surexpression de la protéine chez la *Drosophile* (laboratoire d'Helen McNeil). Ils ont observé les neuroblastes et l'épiderme, et n'ont pas observé de phénotype particulier. Or les neuroblastes se divisent verticalement. Si le rôle de SAPCD2 décrit dans la rétine de souris, à savoir le maintien des divisions horizontales, est conservé chez la *Drosophile*, nous supposons que même en l'absence de *Sapcd2*, l'orientation des neuroblastes n'est pas modifiée. Finalement, si l'on considère que ces protéines clefs de la régulation de l'orientation de la division cellulaire conservent leur rôle entre les neuroblastes de *Drosophile* et la rétine de souris, notre expérience sur la mouche pourrait s'apparenter à un contrôle négatif de l'absence de *Sapcd2*. Nous pouvons conclure que le gène *Sapcd2* semble avoir évolué pour contrôler spécifiquement l'orientation du fuseau mitotique chez les vertébrés.

VII. 2. *Sapcd2* dans la peau et dans le cortex cérébral des vertébrés

Si l'on considère que le rôle SAPCD2 dans la régulation de l'orientation de la division cellulaire dans la rétine est conservé dans l'**épiderme** et le cortex cérébral de la souris, nous ne devrions pas observer de phénotype particulier dans l'épiderme, car comme dans les neuroblastes de *Drosophile*, les divisions sont verticales. Le rôle de SAPCD2 dans le maintien



des divisions horizontales ne serait pas requis. D'ailleurs dans ce modèle, LGN est localisée à la membrane apicale. Avec ou sans *Sapcd2*, nous anticipons que les divisions cellulaires restent apico-basales.

Cependant dans les **progéniteurs neuraux**, nous savons que LGN a une localisation cortico-latérale (Morin *et al.* 2007, Konno *et al.* 2008, Peyre *et al.* 2011), et qu'en son absence dans le cerveau, le nombre de divisions verticales augmente ((Lacomme *et al.* 2016) en annexe 3), comme à E14.5 dans la rétine. Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'action de LGN est conservé entre la rétine et le cerveau à E14.5. Nous pourrions supposer que le rôle de SAPCD2 décrit à E14.5 dans la rétine soit également conservé dans le cerveau. Nous nous attendrions à une localisation de SAPCD2 aux pôles du fuseau mitotique des progéniteurs neuraux s'appêtant à se diviser à l'horizontale, comme dans la rétine à E14.5 ; et qu'en absence de *Sapcd2* dans le cortex cérébral, le nombre de divisions verticales augmente. Dans les souris *Lgn* *-/-*; *Sapcd2* *-/-*, nous anticipons également une augmentation des divisions verticales.

VIII. Quand est-ce que l'orientation finale du fuseau mitotique est déterminée ?

Dans les neuroblastes de *Drosophila*, l'orientation du fuseau mitotique est déterminée à la **fin de la prophase**, même si le fuseau mitotique oscille pendant la métaphase (Rebollo *et al.* 2007, Siller et Doe 2008). Dans le cortex cérébral en développement, la plaque métaphasique tourne complètement jusqu'à la fin de la métaphase, même si des études d'imagerie en temps réel de divisions cellulaires dans le neuroépithélium de poulet montrent que l'orientation finale, planaire, est optée au début de la métaphase, grâce à la localisation cortico-latérale de LGN-NuMA (Peyre *et al.* 2011). Dans la rétine, nous avons comparé l'orientation des métaphases et des anaphases/télophases en présence et en absence de *Sapcd2* et/ou *Lgn*. De façon intéressante, nous avons remarqué que la distribution des angles est similaire entre les deux phases, ce qui est également décrit dans des rétines de rat et de poulet (Tibber *et al.* 2004). Par conséquent, nous proposons que dans la rétine, la décision de l'orientation est prise au cours de la prophase, nonobstant l'oscillation ou la rotation du fuseau mitotique lors de la métaphase, montrée dans des rétines de rat (Tibber *et al.* 2004).



À P0, SAPCD2 est exprimée en prophase et en métaphase, mais ne l'est plus en anaphase/télophase (**figure 26E-I**), alors que LGN est exprimée dans toutes les phases mitotiques (**figure 26M-Q**). Pourquoi l'expression de SAPCD2 est maintenue en métaphase, si l'orientation est décidée en fin de prophase ? Comme proposé suite à l'expérience de délétion clonale de *Lgn* dans des explants de rétine, il se pourrait que le temps de dégradation de LGN soit plus long que celui de SAPCD2 (page 150), ce qui expliquerait également l'expression de LGN dans les phases mitotiques tardives. Nous suggérons que SAPCD2 est nécessaire à **l'induction de l'orientation** du fuseau mitotique, tandis que LGN est nécessaire à l'induction et au **maintien** de la position du fuseau mitotique dans les progéniteurs rétiniens.



Conclusion

Nos découvertes vont contribuer à mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qui contrôlent la taille du lignage neuronal et régulent la production de la **diversité cellulaire** au cours du développement du système nerveux central.

Des mutations dans les gènes impliqués dans la régulation de l'orientation du fuseau mitotique engendrent des **pathologies** comme la lisencéphalie, microcéphalie ou d'autres malformations développementales, telles que le syndrome de surdité génétique de Chudley-McCullough dû à une perte de fonction de *Lgn* (Fish *et al.* 2006, Knoblich 2010, Quyn *et al.* 2010, Doherty *et al.* 2012, Noatynska *et al.* 2012, Bergstralh et St Johnston 2014). Les changements d'orientation de la division cellulaire sont aussi associés à la formation de tumeurs (Quyn *et al.* 2010, Noatynska *et al.* 2012). Or nous savons que *SAPCD2* est surexprimée dans de nombreux cas de **cancers** (Xu *et al.* 2007, Cui *et al.* 2011, Jung *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2012, Sun *et al.* 2013, Yuan *et al.* 2013, Mao *et al.* 2014, Wan *et al.* 2014, Weng *et al.* 2014). Dans un tissu tumoral, la perte de *Sapcd2* provoque l'arrêt de l'entrée en mitose et ainsi l'arrêt de la prolifération cellulaire et de la tumorigénicité. Son expression dépendante du cycle cellulaire, et l'altération de l'expression de cycline B1 et Chk2 en son absence, suggèrent une implication dans la régulation du cycle cellulaire. Comme oncogène, *Sapcd2* pourrait jouer un rôle important dans la transformation des cellules épithéliales en cellules cancéreuses. Pour certains cancers, il représente un **marqueur de diagnostic ou une cible thérapeutique** éventuelle. Dans l'étude du gliome et du cancer colorectal, l'expression de *Sapcd2* est également corrélée à la gravité de la tumeur, suggérant qu'il puisse être impliqué dans la progression des stades tumoraux (Wan *et al.* 2014, Weng *et al.* 2014). Nous présumons que nos découvertes vont contribuer à mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent le développement des pathologies dû à un dérèglement des divisions cellulaires, comme le cancer.

Chez l'humain, *Sapcd2* et *Lgn* ne sont pas référencés dans les gènes responsables d'une **pathologie rétinienne** (<https://sph.uth.edu/retnet/>). Ceci étant, aux vues du phénotype sévère

engendré par la double mutation de *Sapcd2* et *Lgn*, nous pourrions nous attendre à un dysfonctionnement visuel majeur, que nous pourrions examiner.

Nos découvertes contribuent à une meilleure compréhension du développement du système rétinien. En 2012, selon l'enquête Canadienne sur l'incapacité, 756 300 Canadiens de plus de 15 ans sont malvoyants, dont près de 44 000 sont **aveugles** (<http://www.statcan.gc.ca/pub/89-654-x/89-654-x2016001-fra.htm>). À l'échelle internationale, le dernier rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé fait état de 285 millions de personnes atteintes de déficiences visuelles, dont 39 millions seraient aveugles, en 2010 (http://www.who.int/features/factfiles/blindness/blindness_facts/fr/). À ce jour, **aucun traitement curatif** n'existe, des approches thérapeutiques à visée stabilisatrice ou restauratrice de la vision sont néanmoins envisageables. La thérapie génique est la cible de test cliniques prometteurs (Bennett *et al.* 2016, Pichard *et al.* 2016). L'hétérogénéité des gènes impliqués dans les rétinopathies, soit 293 cartographiés en 2016 dont 256 identifiés (<https://sph.uth.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes>), rend difficile d'envisager une thérapie génique adaptée à chaque cas. La **thérapie cellulaire**, qui consiste en un traitement de remplacement des cellules lésées ou mortes par greffe de nouvelles cellules, représente une approche thérapeutique alternative ou complémentaire à la thérapie génique (Pearson 2014). Il s'agit de différencier des photorécepteurs à partir de cellules souches, en mimant le développement de la rétine *in vitro*. Cette stratégie thérapeutique nécessite une compréhension précise du développement du système visuel *in vivo*, des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents qui régulent la prolifération et la différenciation des cellules souches rétiniennes en photorécepteurs.

Une meilleure compréhension du développement de la rétine permet également d'affiner les **diagnostics** des maladies congénitales. En cas de pathologie dégénérative, l'œil est souvent affecté le premier, il peut donc servir d'indicateur, comme dans la maladie d'Alzheimer par exemple.



Bibliographie

- Adams, R. J. (1996). "Metaphase spindles rotate in the neuroepithelium of rat cerebral cortex." J Neurosci **16**(23): 7610-7618.
- Afshar, K., F. S. Willard, K. Colombo, C. A. Johnston, C. R. McCudden, D. P. Siderovski and P. Gonczy (2004). "RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos." Cell **119**(2): 219-230.
- Afshar, K., F. S. Willard, K. Colombo, D. P. Siderovski and P. Gonczy (2005). "Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division." Development **132**(20): 4449-4459.
- Agathocleous, M. and W. A. Harris (2009). "From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina." Annu Rev Cell Dev Biol **25**: 45-69.
- Ahmad, I. (1995). "Mash-1 is expressed during ROD photoreceptor differentiation and binds an E-box, E(opsin)-1 in the rat opsin gene." Brain Res Dev Brain Res **90**(1-2): 184-189.
- Alexiades, M. R. and C. Cepko (1996). "Quantitative analysis of proliferation and cell cycle length during development of the rat retina." Dev Dyn **205**(3): 293-307.
- Alexiades, M. R. and C. L. Cepko (1997). "Subsets of retinal progenitors display temporally regulated and distinct biases in the fates of their progeny." Development **124**(6): 1119-1131.
- Angers, S., C. J. Thorpe, T. L. Biechele, S. J. Goldenberg, N. Zheng, M. J. MacCoss and R. T. Moon (2006). "The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation." Nat Cell Biol **8**(4): 348-357.
- Ashery-Padan, R. and P. Gruss (2001). "Pax6 lights-up the way for eye development." Curr Opin Cell Biol **13**(6): 706-714.
- Assemat, E., E. Bazellieres, E. Pallesi-Pocachard, A. Le Bivic and D. Massey-Harroche (2008). "Polarity complex proteins." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 614-630.
- Atwood, S. X., C. Chabu, R. R. Penkert, C. Q. Doe and K. E. Prehoda (2007). "Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC." J Cell Sci **120**(Pt 18): 3200-3206.
- Badea, T. C., H. Cahill, J. Ecker, S. Hattar and J. Nathans (2009). "Distinct roles of transcription factors brn3a and brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells." Neuron **61**(6): 852-864.
- Baden, T., P. Berens, K. Franke, M. Roman Roson, M. Bethge and T. Euler (2016). "The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse." Nature **529**(7586): 345-350.

Barde, Y. A. (1989). "Trophic factors and neuronal survival." Neuron **2**(6): 1525-1534.

Barnstable, C. J., R. Hofstein and K. Akagawa (1985). "A marker of early amacrine cell development in rat retina." Brain Res **352**(2): 286-290.

Barrera, J. A., L. R. Kao, R. E. Hammer, J. Seemann, J. L. Fuchs and T. L. Megraw (2010). "CDK5RAP2 regulates centriole engagement and cohesion in mice." Dev Cell **18**(6): 913-926.

Bassett, E. A. and V. A. Wallace (2012). "Cell fate determination in the vertebrate retina." Trends Neurosci **35**(9): 565-573.

Baumer, N., T. Marquardt, A. Stoykova, R. Ashery-Padan, K. Chowdhury and P. Gruss (2002). "Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle." Development **129**(19): 4535-4545.

Baye, L. M. and B. A. Link (2007). "Interkinetic nuclear migration and the selection of neurogenic cell divisions during vertebrate retinogenesis." J Neurosci **27**(38): 10143-10152.

Bayraktar, O. A. and C. Q. Doe (2013). "Combinatorial temporal patterning in progenitors expands neural diversity." Nature **498**(7455): 449-455.

Beatty, A., D. Morton and K. Kemphues (2010). "The *C. elegans* homolog of *Drosophila* Lethal giant larvae functions redundantly with PAR-2 to maintain polarity in the early embryo." Development **137**(23): 3995-4004.

Bejarano-Escobar, R., G. Alvarez-Hernan, R. Morona, A. Gonzalez, G. Martin-Partido and J. Francisco-Morcillo (2015). "Expression and function of the LIM-homeodomain transcription factor Islet-1 in the developing and mature vertebrate retina." Exp Eye Res **138**: 22-31.

Bellaiche, Y., M. Gho, J. A. Kaltschmidt, A. H. Brand and F. Schweisguth (2001). "Frizzled regulates localization of cell-fate determinants and mitotic spindle rotation during asymmetric cell division." Nat Cell Biol **3**(1): 50-57.

Bellaiche, Y., A. Radovic, D. F. Woods, C. D. Hough, M. L. Parmentier, C. J. O'Kane, P. J. Bryant and F. Schweisguth (2001). "The Partner of Inscuteable/Discs-large complex is required to establish planar polarity during asymmetric cell division in *Drosophila*." Cell **106**(3): 355-366.

Bellaiche, Y. and F. Schweisguth (2001). "Lineage diversity in the *Drosophila* nervous system." Curr Opin Genet Dev **11**(4): 418-423.

Belliveau, M. J. and C. L. Cepko (1999). "Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina." Development **126**(3): 555-566.

Belliveau, M. J., T. L. Young and C. L. Cepko (2000). "Late retinal progenitor cells show intrinsic limitations in the production of cell types and the kinetics of opsin synthesis." J Neurosci **20**(6): 2247-2254.

Bello, B., H. Reichert and F. Hirth (2006). "The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*." Development **133**(14): 2639-2648.

Bennett, J., J. Wellman, K. A. Marshall, S. McCague, M. Ashtari, J. DiStefano-Pappas, O. U. Elci, D. C. Chung, J. Sun, J. F. Wright, D. R. Cross, P. Aravand, L. L. Cyckowski, J. L. Bennicelli, F. Mingozi, A. Auricchio, E. A. Pierce, J. Ruggiero, B. P. Leroy, F. Simonelli, K. A. High and A. M. Maguire (2016). "Safety and durability of effect of contralateral-eye administration of AAV2 gene therapy in patients with childhood-onset blindness caused by RPE65 mutations: a follow-on phase 1 trial." Lancet **388**(10045): 661-672.

Bergstralh, D. T., T. Haack and D. St Johnston (2013). "Epithelial polarity and spindle orientation: intersecting pathways." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **368**(1629): 20130291.

Bergstralh, D. T. and D. St Johnston (2014). "Spindle orientation: what if it goes wrong?" Semin Cell Dev Biol **34**: 140-145.

Bernardos, R. L., L. K. Barthel, J. R. Meyers and P. A. Raymond (2007). "Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells." J Neurosci **27**(26): 7028-7040.

Bertrand, N., D. S. Castro and F. Guillemot (2002). "Proneural genes and the specification of neural cell types." Nat Rev Neurosci **3**(7): 517-530.

Betschinger, J., K. Mechtler and J. A. Knoblich (2003). "The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl." Nature **422**(6929): 326-330.

Betschinger, J., K. Mechtler and J. A. Knoblich (2006). "Asymmetric segregation of the tumor suppressor brat regulates self-renewal in *Drosophila* neural stem cells." Cell **124**(6): 1241-1253.

Bilder, D., M. Schober and N. Perrimon (2003). "Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity." Nat Cell Biol **5**(1): 53-58.

Blackshaw, S., S. Harpavat, J. Trimarchi, L. Cai, H. Huang, W. P. Kuo, G. Weber, K. Lee, R. E. Fraioli, S. H. Cho, R. Yung, E. Asch, L. Ohno-Machado, W. H. Wong and C. L. Cepko (2004). "Genomic analysis of mouse retinal development." PLoS Biol **2**(9): E247.

Blumer, J. B., L. J. Chandler and S. M. Lanier (2002). "Expression analysis and subcellular distribution of the two G-protein regulators AGS3 and LGN indicate distinct functionality. Localization of LGN to the midbody during cytokinesis." J Biol Chem **277**(18): 15897-15903.

Blumer, J. B., K. Lord, T. L. Saunders, A. Pacchioni, C. Black, E. Lazartigues, K. J. Varner, T. W. Gettys and S. M. Lanier (2008). "Activator of G protein signaling 3 null mice: I. Unexpected alterations in metabolic and cardiovascular function." Endocrinology **149**(8): 3842-3849.

Bohl, J., N. Brimer, C. Lyons and S. B. Vande Pol (2007). "The stardust family protein MPP7 forms a tripartite complex with LIN7 and DLG1 that regulates the stability and localization of DLG1 to cell junctions." J Biol Chem **282**(13): 9392-9400.

Bond, J., E. Roberts, G. H. Mochida, D. J. Hampshire, S. Scott, J. M. Askham, K. Springell, M. Mahadevan, Y. J. Crow, A. F. Markham, C. A. Walsh and C. G. Woods (2002). "ASPM is a major determinant of cerebral cortical size." Nat Genet **32**(2): 316-320.

Bond, J., E. Roberts, K. Springell, S. B. Lizarraga, S. Scott, J. Higgins, D. J. Hampshire, E. E. Morrison, G. F. Leal, E. O. Silva, S. M. Costa, D. Baralle, M. Raponi, G. Karbani, Y. Rashid, H. Jafri, C. Bennett, P. Corry, C. A. Walsh and C. G. Woods (2005). "A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size." Nat Genet **37**(4): 353-355.

Bowman, S. K., R. A. Neumuller, M. Novatchkova, Q. Du and J. A. Knoblich (2006). "The Drosophila NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division." Dev Cell **10**(6): 731-742.

Boyd, L., S. Guo, D. Levitan, D. T. Stinchcomb and K. J. Kemphues (1996). "PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos." Development **122**(10): 3075-3084.

Braunger, B. M., C. Demmer and E. R. Tamm (2014). "Programmed cell death during retinal development of the mouse eye." Adv Exp Med Biol **801**: 9-13.

Broadus, J., S. Fuerstenberg and C. Q. Doe (1998). "Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate." Nature **391**(6669): 792-795.

Brody, T. and W. F. Odenwald (2005). "Regulation of temporal identities during Drosophila neuroblast lineage development." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 672-675.

Brown, N. L., S. Patel, J. Brzezinski and T. Glaser (2001). "Math5 is required for retinal ganglion cell and optic nerve formation." Development **128**(13): 2497-2508.

Buckley, C. E., R. E. Moore, A. Reade, A. R. Goldberg, O. D. Weiner and J. D. Clarke (2016). "Reversible Optogenetic Control of Subcellular Protein Localization in a Live Vertebrate Embryo." Dev Cell **36**(1): 117-126.

Bulgakova, N. A. and E. Knust (2009). "The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration." J Cell Sci **122**(Pt 15): 2587-2596.

Bulgheresi, S., E. Kleiner and J. A. Knoblich (2001). "Inscuteable-dependent apical localization of the microtubule-binding protein Cornetto suggests a role in asymmetric cell division." J Cell Sci **114**(Pt 20): 3655-3662.

Bultje, R. S., D. R. Castaneda-Castellanos, L. Y. Jan, Y. N. Jan, A. R. Kriegstein and S. H. Shi (2009). "Mammalian Par3 regulates progenitor cell asymmetric division via notch signaling in the developing neocortex." Neuron **63**(2): 189-202.

Bunt-Milam, A. H. and J. C. Saari (1983). "Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina." J Cell Biol **97**(3): 703-712.

Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre and J. R. De Mey (1998). "Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells." Curr Biol **8**(9): 541-544.

Cabernard, C. and C. Q. Doe (2009). "Apical/basal spindle orientation is required for neuroblast homeostasis and neuronal differentiation in *Drosophila*." Dev Cell **17**(1): 134-141.

Cai, Y., F. Yu, S. Lin, W. Chia and X. Yang (2003). "Apical complex genes control mitotic spindle geometry and relative size of daughter cells in *Drosophila* neuroblast and pI asymmetric divisions." Cell **112**(1): 51-62.

Carminati, M., S. Gallini, L. Pirovano, A. Alfieri, S. Bisi and M. Mapelli (2016). "Concomitant binding of Afadin to LGN and F-actin directs planar spindle orientation." Nat Struct Mol Biol **23**(2): 155-163.

Cayouette, M. (2003). "The orientation of cell division influences cell-fate choice in the developing mammalian retina." Development **130**(11): 2329-2339.

Cayouette, M., B. A. Barres and M. Raff (2003). "Importance of intrinsic mechanisms in cell fate decisions in the developing rat retina." Neuron **40**(5): 897-904.

Cayouette, M., L. Poggi and W. A. Harris (2006). "Lineage in the vertebrate retina." Trends Neurosci **29**(10): 563-570.

Cayouette, M. and M. Raff (2002). "Asymmetric segregation of Numb: a mechanism for neural specification from *Drosophila* to mammals." Nat Neurosci **5**(12): 1265-1269.

Cayouette, M., A. V. Whitmore, G. Jeffery and M. Raff (2001). "Asymmetric segregation of Numb in retinal development and the influence of the pigmented epithelium." J Neurosci **21**(15): 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**(1): 37-46.

Cepko, C. L., C. P. Austin, X. Yang, M. Alexiades and D. Ezzeddine (1996). "Cell fate determination in the vertebrate retina." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(2): 589-595.

Chen, L., P. Yang and A. Kijlstra (2002). "Distribution, markers, and functions of retinal microglia." Ocul Immunol Inflamm **10**(1): 27-39.

Chen, S., Q. L. Wang, Z. Nie, H. Sun, G. Lennon, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins and D. J. Zack (1997). "Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes." Neuron **19**(5): 1017-1030.

Cheng, N. N., C. M. Kirby and K. J. Kemphues (1995). "Control of cleavage spindle orientation in *Caenorhabditis elegans*: the role of the genes *par-2* and *par-3*." Genetics **139**(2): 549-559.

Chenn, A. and S. K. McConnell (1995). "Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis." Cell **82**(4): 631-641.

Chiang, C., Y. Litingtung, E. Lee, K. E. Young, J. L. Corden, H. Westphal and P. A. Beachy (1996). "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function." Nature **383**(6599): 407-413.

Chiu, C. W., C. Monat, M. Robitaille, M. Lacomme, A. M. Daulat, G. Macleod, H. McNeill, M. Cayouette and S. Angers (2016). "SAPCD2 Controls Spindle Orientation and Asymmetric Divisions by Negatively Regulating the Galphai-LGN-NuMA Ternary Complex." Dev Cell **36**(1): 50-62.

Cho, S. H., J. Y. Kim, D. L. Simons, J. Y. Song, J. H. Le, E. C. Swindell, M. Jamrich, S. M. Wu and S. Kim (2012). "Genetic ablation of *Pals1* in retinal progenitor cells models the retinal pathology of Leber congenital amaurosis." Hum Mol Genet **21**(12): 2663-2676.

Choksi, S. P., T. D. Southall, T. Bossing, K. Edoff, E. de Wit, B. E. Fischer, B. van Steensel, G. Micklem and A. H. Brand (2006). "Prospero acts as a binary switch between self-renewal and differentiation in *Drosophila* neural stem cells." Dev Cell **11**(6): 775-789.

Chow, R. L., C. R. Altmann, R. A. Lang and A. Hemmati-Brivanlou (1999). "Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate." Development **126**(19): 4213-4222.

Chow, R. L. and R. A. Lang (2001). "Early eye development in vertebrates." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 255-296.

Cid, E., A. Santos-Ledo, M. Parrilla-Monge, C. Lillo, R. Arevalo, J. M. Lara, J. Aijon and A. Velasco (2010). "Prox1 expression in rod precursors and Muller cells." Exp Eye Res **90**(2): 267-276.

Cleary, M. D. and C. Q. Doe (2006). "Regulation of neuroblast competence: multiple temporal identity factors specify distinct neuronal fates within a single early competence window." Genes Dev **20**(4): 429-434.

Cohen, A. R., F. L. Gomes, B. Roysam and M. Cayouette (2010). "Computational prediction of neural progenitor cell fates." Nat Methods **7**(3): 213-218.

Colombo, K., S. W. Grill, R. J. Kimple, F. S. Willard, D. P. Siderovski and P. Gonczy (2003). "Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos." Science **300**(5627): 1957-1961.

Conduit, P. T. and J. W. Raff (2010). "Cnn dynamics drive centrosome size asymmetry to ensure daughter centriole retention in *Drosophila* neuroblasts." Curr Biol **20**(24): 2187-2192.

Conduit, P. T., J. H. Richens, A. Wainman, J. Holder, C. C. Vicente, M. B. Pratt, C. I. Dix, Z. A. Novak, I. M. Dobbie, L. Schermelleh and J. W. Raff (2014). "A molecular mechanism of mitotic centrosome assembly in *Drosophila*." Elife **3**: e03399.

Conduit, P. T., A. Wainman and J. W. Raff (2015). "Centrosome function and assembly in animal cells." Nat Rev Mol Cell Biol **16**(10): 611-624.

Cong, W., T. Hirose, Y. Harita, A. Yamashita, K. Mizuno, H. Hirano and S. Ohno (2010). "ASPP2 regulates epithelial cell polarity through the PAR complex." Curr Biol **20**(15): 1408-1414.

Coquelle, F. M., M. Caspi, F. P. Cordelieres, J. P. Dompierre, D. L. Dujardin, C. Koifman, P. Martin, C. C. Hoogenraad, A. Akhmanova, N. Galjart, J. R. De Mey and O. Reiner (2002). "LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway." Mol Cell Biol **22**(9): 3089-3102.

Costa, M. R., G. Wen, A. Lepier, T. Schroeder and M. Gotz (2008). "Par-complex proteins promote proliferative progenitor divisions in the developing mouse cerebral cortex." Development **135**(1): 11-22.

Couwenbergs, C., J. C. Labbe, M. Goulding, T. Marty, B. Bowerman and M. Gotta (2007). "Heterotrimeric G protein signaling functions with dynein to promote spindle positioning in *C. elegans*." J Cell Biol **179**(1): 15-22.

Couwenbergs, C., A. C. Spilker and M. Gotta (2004). "Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by *C. elegans* RIC-8." Curr Biol **14**(20): 1871-1876.

Cuenca, A. A., A. Schetter, D. Aceto, K. Kemphues and G. Seydoux (2003). "Polarization of the *C. elegans* zygote proceeds via distinct establishment and maintenance phases." Development **130**(7): 1255-1265.

Cui, Y., W. Y. Su, J. Xing, Y. C. Wang, P. Wang, X. Y. Chen, Z. Y. Shen, H. Cao, Y. Y. Lu and J. Y. Fang (2011). "MiR-29a inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest through the downregulation of p42.3 in human gastric cancer." PLoS One **6**(10): e25872.

Culurgioni, S., A. Alfieri, V. Pendolino, F. Laddomada and M. Mapelli (2011). "Inscuteable and NuMA proteins bind competitively to Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN) during asymmetric cell divisions." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(52): 20998-21003.

Das, R. M. and K. G. Storey (2012). "Mitotic spindle orientation can direct cell fate and bias Notch activity in chick neural tube." EMBO Rep **13**(5): 448-454.

Das, T., B. Payer, M. Cayouette and W. A. Harris (2003). "In vivo time-lapse imaging of cell divisions during neurogenesis in the developing zebrafish retina." Neuron **37**(4): 597-609.

David, N. B., C. A. Martin, M. Segalen, F. Rosenfeld, F. Schweisguth and Y. Bellaiche (2005). "*Drosophila* Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division." Nat Cell Biol **7**(11): 1083-1090.

den Hollander, A. I., M. Ghiani, Y. J. de Kok, J. Wijnholds, A. Ballabio, F. P. Cremers and V. Broccoli (2002). "Isolation of *Crb1*, a mouse homologue of *Drosophila* crumbs, and analysis of its expression pattern in eye and brain." Mech Dev **110**(1-2): 203-207.

den Hollander, A. I., J. R. Heckenlively, L. I. van den Born, Y. J. de Kok, S. D. van der Velde-Visser, U. Kellner, B. Jurklies, M. J. van Schooneveld, A. Blankenagel, K. Rohrschneider, B. Wissinger, J. R. Cruysberg, A. F. Deutman, H. G. Brunner, E. Apfelstedt-Sylla, C. B. Hoyng and F. P. Cremers (2001). "Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (*CRB1*) gene." Am J Hum Genet **69**(1): 198-203.

den Hollander, A. I., J. B. ten Brink, Y. J. de Kok, S. van Soest, L. I. van den Born, M. A. van Driel, D. J. van de Pol, A. M. Payne, S. S. Bhattacharya, U. Kellner, C. B. Hoyng, A. Westerveld, H. G. Brunner, E. M. Bleeker-Wagemakers, A. F. Deutman, J. R. Heckenlively, F. P. Cremers and A. A. Bergen (1999). "Mutations in a human homologue of *Drosophila* crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12)." Nat Genet **23**(2): 217-221.

Derouiche, A. and T. Rauen (1995). "Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance." J Neurosci Res **42**(1): 131-143.

Dewey, E. B., D. T. Taylor and C. A. Johnston (2015). "Cell Fate Decision Making through Oriented Cell Division." J Dev Biol **3**(4): 129-157.

di Pietro, F., A. Echard and X. Morin (2016). "Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view." EMBO Rep **17**(8): 1106-1130.

do Carmo Avides, M. and D. M. Glover (1999). "Abnormal spindle protein, Asp, and the integrity of mitotic centrosomal microtubule organizing centers." Science **283**(5408): 1733-1735.

Dobyns, W. B., O. Reiner, R. Carrozzo and D. H. Ledbetter (1993). "Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the *LIS1* gene located at chromosome 17p13." JAMA **270**(23): 2838-2842.

Doe, C. Q. (2008). "Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation." Development **135**(9): 1575-1587.

Doe, C. Q. and G. M. Technau (1993). "Identification and cell lineage of individual neural precursors in the *Drosophila* CNS." Trends Neurosci **16**(12): 510-514.

Doherty, D., A. E. Chudley, G. Coghlan, G. E. Ishak, A. M. Innes, E. G. Lemire, R. C. Rogers, A. A. Mhanni, I. G. Phelps, S. J. Jones, S. H. Zhan, A. P. Fejes, H. Shahin, M. Kanaan, H. Akay, M. Tekin, F. C. Consortium, B. Triggs-Raine and T. Zelinski (2012). "GPSM2 mutations cause the brain

malformations and hearing loss in Chudley-McCullough syndrome." Am J Hum Genet **90**(6): 1088-1093.

Donovan, S. L. and M. A. Dyer (2005). "Regulation of proliferation during central nervous system development." Semin Cell Dev Biol **16**(3): 407-421.

Dooley, C. M., J. James, C. Jane McGlade and I. Ahmad (2003). "Involvement of numb in vertebrate retinal development: evidence for multiple roles of numb in neural differentiation and maturation." J Neurobiol **54**(2): 313-325.

Dorsky, R. I., W. S. Chang, D. H. Rapaport and W. A. Harris (1997). "Regulation of neuronal diversity in the *Xenopus* retina by Delta signalling." Nature **385**(6611): 67-70.

Du, Q. and I. G. Macara (2004). "Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins." Cell **119**(4): 503-516.

Du, Q., P. T. Stukenberg and I. G. Macara (2001). "A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization." Nat Cell Biol **3**(12): 1069-1075.

Dyer, M. A. and C. L. Cepko (2000). "Control of Muller glial cell proliferation and activation following retinal injury." Nat Neurosci **3**(9): 873-880.

Dyer, M. A. and C. L. Cepko (2001). "p27Kip1 and p57Kip2 regulate proliferation in distinct retinal progenitor cell populations." J Neurosci **21**(12): 4259-4271.

Dyer, M. A. and C. L. Cepko (2001). "Regulating proliferation during retinal development." Nat Rev Neurosci **2**(5): 333-342.

Dyer, M. A., F. J. Livesey, C. L. Cepko and G. Oliver (2003). "Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina." Nat Genet **34**(1): 53-58.

Elliott, J., C. Jolicoeur, V. Ramamurthy and M. Cayouette (2008). "Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells." Neuron **60**(1): 26-39.

Elshatory, Y., M. Deng, X. Xie and L. Gan (2007). "Expression of the LIM-homeodomain protein Isl1 in the developing and mature mouse retina." J Comp Neurol **503**(1): 182-197.

Elshatory, Y., D. Everhart, M. Deng, X. Xie, R. B. Barlow and L. Gan (2007). "Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells." J Neurosci **27**(46): 12707-12720.

Emerson, M. M., N. Surzenko, J. J. Goetz, J. Trimarchi and C. L. Cepko (2013). "Otx2 and Onecut1 promote the fates of cone photoreceptors and horizontal cells and repress rod photoreceptors." Dev Cell **26**(1): 59-72.

Etemad-Moghadam, B., S. Guo and K. J. Kemphues (1995). "Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos." Cell **83**(5): 743-752.

Ezan, J., L. Lasvaux, A. Gezer, A. Novakovic, H. May-Simera, E. Belotti, A. C. Lhoumeau, L. Birnbaumer, S. Beer-Hammer, J. P. Borg, A. Le Bivic, B. Nurnberg, N. Sans and M. Montcouquiol (2013). "Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton." Nat Cell Biol **15**(9): 1107-1115.

Fantl, V., G. Stamp, A. Andrews, I. Rosewell and C. Dickson (1995). "Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development." Genes & Development **9**(19): 2364-2372.

Fietz, S. A., I. Kelava, J. Vogt, M. Wilsch-Brauninger, D. Stenzel, J. L. Fish, D. Corbeil, A. Riehn, W. Distler, R. Nitsch and W. B. Huttner (2010). "OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling." Nat Neurosci **13**(6): 690-699.

Fischer, A. J. and T. A. Reh (2001). "Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina." Nat Neurosci **4**(3): 247-252.

Fish, J. L., Y. Kosodo, W. Enard, S. Paabo and W. B. Huttner (2006). "Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10438-10443.

Fuhrmann, S. (2008). "Wnt signaling in eye organogenesis." Organogenesis **4**(2): 60-67.

Fujitani, Y., S. Fujitani, H. Luo, F. Qiu, J. Burlison, Q. Long, Y. Kawaguchi, H. Edlund, R. J. MacDonald, T. Furukawa, T. Fujikado, M. A. Magnuson, M. Xiang and C. V. Wright (2006). "Ptf1a determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development." Development **133**(22): 4439-4450.

Fuse, N., K. Hisata, A. L. Katzen and F. Matsuzaki (2003). "Heterotrimeric G proteins regulate daughter cell size asymmetry in Drosophila neuroblast divisions." Curr Biol **13**(11): 947-954.

Gai, M., F. T. Bianchi, C. Vagnoni, F. Verni, S. Bonaccorsi, S. Pasquero, G. E. Berto, F. Sgro, A. M. Chiotto, L. Annaratone, A. Sapino, A. Bergo, N. Landsberger, J. Bond, W. B. Huttner and F. Di Cunto (2016). "ASPM and CITK regulate spindle orientation by affecting the dynamics of astral microtubules." EMBO Rep **17**(10): 1396-1409.

Gaiano, N. and G. Fishell (2002). "The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates." Annu Rev Neurosci **25**: 471-490.

Gallini, S., M. Carminati, F. De Mattia, L. Pirovano, E. Martini, A. Oldani, I. A. Asteriti, G. Guarguaglini and M. Mapelli (2016). "NuMA Phosphorylation by Aurora-A Orchestrates Spindle Orientation." Curr Biol **26**(4): 458-469.

Gan, L., M. Xiang, L. Zhou, D. S. Wagner, W. H. Klein and J. Nathans (1996). "POU domain factor Brn-3b is required for the development of a large set of retinal ganglion cells." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(9): 3920-3925.

Geng, Y., Q. Yu, E. Sicinska, M. Das, R. T. Bronson and P. Sicinski (2001). "Deletion of the p27Kip1 gene restores normal development in cyclin D1-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 194-199.

Georgopoulos, K., D. D. Moore and B. Derfler (1992). "Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment." Science **258**(5083): 808-812.

Gho, M., Y. Bellaiche and F. Schweisguth (1999). "Revisiting the Drosophila microchaete lineage: a novel intrinsically asymmetric cell division generates a glial cell." Development **126**(16): 3573-3584.

Gho, M. and F. Schweisguth (1998). "Frizzled signalling controls orientation of asymmetric sense organ precursor cell divisions in Drosophila." Nature **393**(6681): 178-181.

Gillies, T. E. and C. Cabernard (2011). "Cell division orientation in animals." Curr Biol **21**(15): R599-609.

Glotzer, M. (2009). "The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(1): 9-20.

Goldstein, B. and I. G. Macara (2007). "The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization." Dev Cell **13**(5): 609-622.

Gomes, F. L., G. Zhang, F. Carbonell, J. A. Correa, W. A. Harris, B. D. Simons and M. Cayouette (2011). "Reconstruction of rat retinal progenitor cell lineages in vitro reveals a surprising degree of stochasticity in cell fate decisions." Development **138**(2): 227-235.

Gonczy, P. (2003). "[Mechanisms of cell division: lessons from a nematode]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 735-742.

Gonczy, P. (2008). "Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(5): 355-366.

Gonczy, P., C. Echeverri, K. Oegema, A. Coulson, S. J. Jones, R. R. Copley, J. Duperon, J. Oegema, M. Brehm, E. Cassin, E. Hannak, M. Kirkham, S. Pichler, K. Flohrs, A. Goessen, S. Leidel, A. M. Alleaume, C. Martin, N. Ozlu, P. Bork and A. A. Hyman (2000). "Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III." Nature **408**(6810): 331-336.

Gonzalez, C. (2007). "Spindle orientation, asymmetric division and tumour suppression in Drosophila stem cells." Nat Rev Genet **8**(6): 462-472.

Gosens, I., A. I. den Hollander, F. P. Cremers and R. Roepman (2008). "Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina." Exp Eye Res **86**(5): 713-726.

Gotta, M., Y. Dong, Y. K. Peterson, S. M. Lanier and J. Ahringer (2003). "Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo." Curr Biol **13**(12): 1029-1037.

Gotz, M. and W. B. Huttner (2005). "The cell biology of neurogenesis." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(10): 777-788.

Graw, J. (2010). "Eye development." Curr Top Dev Biol **90**: 343-386.

Gray, G. E., J. C. Glover, J. Majors and J. R. Sanes (1988). "Radial arrangement of clonally related cells in the chicken optic tectum: lineage analysis with a recombinant retrovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7356-7360.

Grosskortenhaus, R., K. J. Robinson and C. Q. Doe (2006). "Pdm and Castor specify late-born motor neuron identity in the NB7-1 lineage." Genes Dev **20**(18): 2618-2627.

Guo, M., L. Y. Jan and Y. N. Jan (1996). "Control of daughter cell fates during asymmetric division: interaction of Numb and Notch." Neuron **17**(1): 27-41.

Guo, S. and K. J. Kemphues (1995). "par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed." Cell **81**(4): 611-620.

Halder, G., P. Callaerts and W. J. Gehring (1995). "Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*." Science **267**(5205): 1788-1792.

Hamazaki, Y., M. Itoh, H. Sasaki, M. Furuse and S. Tsukita (2002). "Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule." J Biol Chem **277**(1): 455-461.

Hamon, A., J. E. Roger, X. J. Yang and M. Perron (2016). "Muller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems." Dev Dyn **245**(7): 727-738.

Hampoelz, B., O. Hoeller, S. K. Bowman, D. Dunican and J. A. Knoblich (2005). "*Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins." Nat Cell Biol **7**(11): 1099-1105.

Hansen, D. V., J. H. Lui, P. R. Parker and A. R. Kriegstein (2010). "Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex." Nature **464**(7288): 554-561.

Hao, Y., Q. Du, X. Chen, Z. Zheng, J. L. Balsbaugh, S. Maitra, J. Shabanowitz, D. F. Hunt and I. G. Macara (2010). "Par3 controls epithelial spindle orientation by aPKC-mediated phosphorylation of apical Pins." Curr Biol **20**(20): 1809-1818.

Haren, L. and A. Merdes (2002). "Direct binding of NuMA to tubulin is mediated by a novel sequence motif in the tail domain that bundles and stabilizes microtubules." J Cell Sci **115**(Pt 9): 1815-1824.

Harris, K. P. and U. Tepass (2008). "Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis." J Cell Biol **183**(6): 1129-1143.

Hartsock, A. and W. J. Nelson (2008). "Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 660-669.

Hatakeyama, J. and R. Kageyama (2004). "Retinal cell fate determination and bHLH factors." Semin Cell Dev Biol **15**(1): 83-89.

Hatakeyama, J., K. Tomita, T. Inoue and R. Kageyama (2001). "Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type." Development **128**(8): 1313-1322.

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

Haydar, T. F., E. Ang, Jr. and P. Rakic (2003). "Mitotic spindle rotation and mode of cell division in the developing telencephalon." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2890-2895.

He, J., G. Zhang, A. D. Almeida, M. Cayouette, B. D. Simons and W. A. Harris (2012). "How variable clones build an invariant retina." Neuron **75**(5): 786-798.

Hess, H. A., J. C. Roper, S. W. Grill and M. R. Koelle (2004). "RGS-7 completes a receptor-independent heterotrimeric G protein cycle to asymmetrically regulate mitotic spindle positioning in *C. elegans*." Cell **119**(2): 209-218.

Hill, R. E., J. Favor, B. L. Hogan, C. C. Ton, G. F. Saunders, I. M. Hanson, J. Prosser, T. Jordan, N. D. Hastie and V. van Heyningen (1991). "Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene." Nature **354**(6354): 522-525.

Hirata, J., H. Nakagoshi, Y. Nabeshima and F. Matsuzaki (1995). "Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development." Nature **377**(6550): 627-630.

Hoegge, C., A. T. Constantinescu, A. Schwager, N. W. Goehring, P. Kumar and A. A. Hyman (2010). "LGL can partition the cortex of one-cell *Caenorhabditis elegans* embryos into two domains." Curr Biol **20**(14): 1296-1303.

Holt, C. E., T. W. Bertsch, H. M. Ellis and W. A. Harris (1988). "Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date." Neuron **1**(1): 15-26.

Hotz, M., C. Leisner, D. Chen, C. Manatschal, T. Wegleiter, J. Ouellet, D. Lindstrom, D. E. Gottschling, J. Vogel and Y. Barral (2012). "Spindle pole bodies exploit the mitotic exit network in metaphase to drive their age-dependent segregation." Cell **148**(5): 958-972.

Howell, B. J., B. F. McEwen, J. C. Canman, D. B. Hoffman, E. M. Farrar, C. L. Rieder and E. D. Salmon (2001). "Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation." J Cell Biol **155**(7): 1159-1172.

Hu, M. and S. S. Easter (1999). "Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells." Dev Biol **207**(2): 309-321.

Huang, E. J., H. Li, A. A. Tang, A. K. Wiggins, R. L. Neve, W. Zhong, L. Y. Jan and Y. N. Jan (2005). "Targeted deletion of numb and numbl like in sensory neurons reveals their essential functions in axon arborization." Genes Dev **19**(1): 138-151.

Hughes, J. R., S. L. Bullock and D. Ish-Horowicz (2004). "Inscuteable mRNA localization is dynein-dependent and regulates apicobasal polarity and spindle length in *Drosophila* neuroblasts." Curr Biol **14**(21): 1950-1956.

Hung, T. J. and K. J. Kemphues (1999). "PAR-6 is a conserved PDZ domain-containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos." Development **126**(1): 127-135.

Hutterer, A., J. Betschinger, M. Petronczki and J. A. Knoblich (2004). "Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during *Drosophila* embryogenesis." Dev Cell **6**(6): 845-854.

Inoue, S. (2008). "Microtubule dynamics in cell division: exploring living cells with polarized light microscopy." Annu Rev Cell Dev Biol **24**: 1-28.

Isshiki, T., B. Pearson, S. Holbrook and C. Q. Doe (2001). "*Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny." Cell **106**(4): 511-521.

Izaki, T., S. Kamakura, M. Kohjima and H. Sumimoto (2006). "Two forms of human Inscuteable-related protein that links Par3 to the Pins homologues LGN and AGS3." Biochem Biophys Res Commun **341**(4): 1001-1006.

Izumi, Y., N. Ohta, K. Hisata, T. Raabe and F. Matsuzaki (2006). "*Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization." Nat Cell Biol **8**(6): 586-593.

Izumi, Y., N. Ohta, A. Itoh-Furuya, N. Fuse and F. Matsuzaki (2004). "Differential functions of G protein and Baz-aPKC signaling pathways in *Drosophila* neuroblast asymmetric division." J Cell Biol **164**(5): 729-738.

Jacobs, G. H., J. F. Deegan, 2nd, J. Neitz, M. A. Crognale and M. Neitz (1993). "Photopigments and color vision in the nocturnal monkey, *Aotus*." Vision Res **33**(13): 1773-1783.

Jadhav, A. P., S. H. Cho and C. L. Cepko (2006). "Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 18998-19003.

Jadhav, A. P., H. A. Mason and C. L. Cepko (2006). "Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina." Development **133**(5): 913-923.

Januschke, J. and C. Gonzalez (2010). "The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts." J Cell Biol **188**(5): 693-706.

Januschke, J., S. Llamazares, J. Reina and C. Gonzalez (2011). "Drosophila neuroblasts retain the daughter centrosome." Nat Commun **2**: 243.

Jasoni, C. L. and T. A. Reh (1996). "Temporal and spatial pattern of MASH-1 expression in the developing rat retina demonstrates progenitor cell heterogeneity." J Comp Neurol **369**(2): 319-327.

Jensen, A. M. and V. A. Wallace (1997). "Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina." Development **124**(2): 363-371.

Jin, J., F. D. Smith, C. Stark, C. D. Wells, J. P. Fawcett, S. Kulkarni, P. Metalnikov, P. O'Donnell, P. Taylor, L. Taylor, A. Zougman, J. R. Woodgett, L. K. Langeberg, J. D. Scott and T. Pawson (2004). "Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization." Curr Biol **14**(16): 1436-1450.

Johnston, C. A., C. Q. Doe and K. E. Prehoda (2012). "Structure of an enzyme-derived phosphoprotein recognition domain." PLoS One **7**(4): e36014.

Johnston, C. A., K. Hirono, K. E. Prehoda and C. Q. Doe (2009). "Identification of an Aurora-A/PinsLINKER/Dlg spindle orientation pathway using induced cell polarity in S2 cells." Cell **138**(6): 1150-1163.

Johnston, C. A., L. Manning, M. S. Lu, O. Golub, C. Q. Doe and K. E. Prehoda (2013). "Formin-mediated actin polymerization cooperates with Mushroom body defect (Mud)-Dynein during Frizzled-Dishevelled spindle orientation." J Cell Sci **126**(Pt 19): 4436-4444.

Jung, Y., S. Lee, H. S. Choi, S. N. Kim, E. Lee, Y. Shin, J. Seo, B. Kim, Y. Jung, W. K. Kim, H. K. Chun, W. Y. Lee and J. Kim (2011). "Clinical Validation of Colorectal Cancer Biomarkers Identified from Bioinformatics Analysis of Public Expression Data." Clinical Cancer Research **17**(4): 700-709.

Juschke, C., Y. Xie, M. P. Postiglione and J. A. Knoblich (2014). "Analysis and modeling of mitotic spindle orientations in three dimensions." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(3): 1014-1019.

Kamberov, E., O. Makarova, M. Roh, A. Liu, D. Karnak, S. Straight and B. Margolis (2000). "Molecular cloning and characterization of Pals, proteins associated with mLin-7." J Biol Chem **275**(15): 11425-11431.

Kaushik, R., F. Yu, W. Chia, X. Yang and S. Bahri (2003). "Subcellular localization of LGN during mitosis: evidence for its cortical localization in mitotic cell culture systems and its requirement for normal cell cycle progression." Mol Biol Cell **14**(8): 3144-3155.

Kechad, A., C. Jolicoeur, A. Tufford, P. Mattar, R. W. Chow, W. A. Harris and M. Cayouette (2012). "Numb is required for the production of terminal asymmetric cell divisions in the developing mouse retina." J Neurosci **32**(48): 17197-17210.

Keeley, P. W., G. Luna, R. N. Fariss, K. A. Skyles, N. R. Madsen, M. A. Raven, R. A. Poche, E. C. Swindell, M. Jamrich, E. C. Oh, A. Swaroop, S. K. Fisher and B. E. Reese (2013). "Development and plasticity of outer retinal circuitry following genetic removal of horizontal cells." J Neurosci **33**(45): 17847-17862.

Kemphues, K. J., J. R. Priess, D. G. Morton and N. S. Cheng (1988). "Identification of genes required for cytoplasmic localization in early *C. elegans* embryos." Cell **52**(3): 311-320.

Kerov, V. S., M. Natchin and N. O. Artemyev (2005). "Interaction of transducin- α with LGN, a G-protein modulator expressed in photoreceptor cells." Mol Cell Neurosci **28**(3): 485-495.

Kim, J., H. H. Wu, A. D. Lander, K. M. Lyons, M. M. Matzuk and A. L. Calof (2005). "GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina." Science **308**(5730): 1927-1930.

Kim, J. W., H. J. Yang, A. P. Oel, M. J. Brooks, L. Jia, D. C. Plachetzki, W. Li, W. T. Allison and A. Swaroop (2016). "Recruitment of Rod Photoreceptors from Short-Wavelength-Sensitive Cones during the Evolution of Nocturnal Vision in Mammals." Dev Cell **37**(6): 520-532.

Kiyomitsu, T. and I. M. Cheeseman (2012). "Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation." Nat Cell Biol **14**(3): 311-317.

Kiyomitsu, T. and I. M. Cheeseman (2013). "Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase." Cell **154**(2): 391-402.

Klebes, A. and E. Knust (2000). "A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in *Drosophila*." Curr Biol **10**(2): 76-85.

Klimova, L., B. Antosova, A. Kuzelova, H. Strnad and Z. Kozmik (2015). "Onecut1 and Onecut2 transcription factors operate downstream of Pax6 to regulate horizontal cell development." Dev Biol **402**(1): 48-60.

Knoblich, J. A. (2008). "Mechanisms of asymmetric stem cell division." Cell **132**(4): 583-597.

Knoblich, J. A. (2010). "Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(12): 849-860.

Knoblich, J. A., L. Y. Jan and Y. N. Jan (1995). "Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division." Nature **377**(6550): 624-627.

Koch, U., R. Lehal and F. Radtke (2013). "Stem cells living with a Notch." Development **140**(4): 689-704.

Konno, D., G. Shioi, A. Shitamukai, A. Mori, H. Kiyonari, T. Miyata and F. Matsuzaki (2008). "Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis." Nat Cell Biol **10**(1): 93-101.

Kosodo, Y., K. Roper, W. Haubensak, A. M. Marzesco, D. Corbeil and W. B. Huttner (2004). "Asymmetric distribution of the apical plasma membrane during neurogenic divisions of mammalian neuroepithelial cells." *EMBO J* **23**(11): 2314-2324.

Kotak, S., C. Busso and P. Gonczy (2012). "Cortical dynein is critical for proper spindle positioning in human cells." *J Cell Biol* **199**(1): 97-110.

Kotak, S., C. Busso and P. Gonczy (2013). "NuMA phosphorylation by CDK1 couples mitotic progression with cortical dynein function." *EMBO J* **32**(18): 2517-2529.

Kotak, S., C. Busso and P. Gonczy (2014). "NuMA interacts with phosphoinositides and links the mitotic spindle with the plasma membrane." *EMBO J* **33**(16): 1815-1830.

Kotak, S. and P. Gonczy (2014). "NuMA phosphorylation dictates dynein-dependent spindle positioning." *Cell Cycle* **13**(2): 177-178.

Kouprina, N., A. Pavlicek, N. K. Collins, M. Nakano, V. N. Noskov, J. Ohzeki, G. H. Mochida, J. I. Risinger, P. Goldsmith, M. Gunsior, G. Solomon, W. Gersch, J. H. Kim, J. C. Barrett, C. A. Walsh, J. Jurka, H. Masumoto and V. Larionov (2005). "The microcephaly ASPM gene is expressed in proliferating tissues and encodes for a mitotic spindle protein." *Hum Mol Genet* **14**(15): 2155-2165.

Kraut, R., W. Chia, L. Y. Jan, Y. N. Jan and J. A. Knoblich (1996). "Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*." *Nature* **383**(6595): 50-55.

Krueger, L. E., J. C. Wu, M. F. Tsou and L. S. Rose (2010). "LET-99 inhibits lateral posterior pulling forces during asymmetric spindle elongation in *C. elegans* embryos." *J Cell Biol* **189**(3): 481-495.

Lacomme, M., B. Tarchini, C. Boudreau-Pinsonneault, C. Monat and M. Cayouette (2016). "The LGN protein promotes planar proliferative divisions in the neocortex but apicobasal asymmetric terminal divisions in the retina." *Development* **143**(4): 575-581.

LaMonica, B. E., J. H. Lui, D. V. Hansen and A. R. Kriegstein (2013). "Mitotic spindle orientation predicts outer radial glial cell generation in human neocortex." *Nat Commun* **4**: 1665.

Lancaster, M. A. and J. A. Knoblich (2012). "Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development." *Curr Opin Neurobiol* **22**(5): 737-746.

Larhammar, D., K. Nordstrom and T. A. Larsson (2009). "Evolution of vertebrate rod and cone phototransduction genes." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1531): 2867-2880.

Le Borgne, R., A. Bardin and F. Schweisguth (2005). "The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling." *Development* **132**(8): 1751-1762.

Lechler, T. and E. Fuchs (2005). "Asymmetric cell divisions promote stratification and differentiation of mammalian skin." *Nature* **437**(7056): 275-280.

Lee, C. Y., R. O. Andersen, C. Cabernard, L. Manning, K. D. Tran, M. J. Lanskey, A. Bashirullah and C. Q. Doe (2006). "Drosophila Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation." Genes Dev **20**(24): 3464-3474.

Lee, C. Y., B. D. Wilkinson, S. E. Siegrist, R. P. Wharton and C. Q. Doe (2006). "Brat is a Miranda cargo protein that promotes neuronal differentiation and inhibits neuroblast self-renewal." Dev Cell **10**(4): 441-449.

Lehre, K. P., S. Davanger and N. C. Danbolt (1997). "Localization of the glutamate transporter protein GLAST in rat retina." Brain Res **744**(1): 129-137.

Lemmers, C., E. Medina, M. H. Delgrossi, D. Michel, J. P. Arsanto and A. Le Bivic (2002). "hINAD1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells." J Biol Chem **277**(28): 25408-25415.

Levine, E. M., J. Close, M. Fero, A. Ostrovsky and T. A. Reh (2000). "p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina." Dev Biol **219**(2): 299-314.

Levine, E. M., H. Roelink, J. Turner and T. A. Reh (1997). "Sonic hedgehog promotes rod photoreceptor differentiation in mammalian retinal cells in vitro." J Neurosci **17**(16): 6277-6288.

Li, H., C. Tierney, L. Wen, J. Y. Wu and Y. Rao (1997). "A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate." Development **124**(3): 603-615.

Li, J., W. L. Lee and J. A. Cooper (2005). "NudEL targets dynein to microtubule ends through LIS1." Nat Cell Biol **7**(7): 686-690.

Li, L. and H. Vaessin (2000). "Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during Drosophila neurogenesis." Genes Dev **14**(2): 147-151.

Li, P., X. Yang, M. Wasser, Y. Cai and W. Chia (1997). "Inscuteable and Staufien mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during Drosophila neuroblast cell divisions." Cell **90**(3): 437-447.

Li, P. H., W. J. Cao, L. L. Mao, H. Huang, J. N. Zheng and D. S. Pei (2014). "p42.3 promotes cell proliferation and invasion in human Renal-Cell Carcinoma." Int J Clin Exp Med **7**(12): 4959-4966.

Li, S., Z. Mo, X. Yang, S. M. Price, M. M. Shen and M. Xiang (2004). "Foxn4 controls the genesis of amacrine and horizontal cells by retinal progenitors." Neuron **43**(6): 795-807.

Li, S. and H. Wang (2016). "Tug of War in Spindle Orientation." Dev Cell **36**(1): 1-2.

Ligon, L. A., S. Karki, M. Tokito and E. L. Holzbaur (2001). "Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions." Nat Cell Biol **3**(10): 913-917.

- Linden, R., R. A. Martins and M. S. Silveira (2005). "Control of programmed cell death by neurotransmitters and neuropeptides in the developing mammalian retina." Prog Retin Eye Res **24**(4): 457-491.
- Litingtung, Y. and C. Chiang (2000). "Control of Shh activity and signaling in the neural tube." Dev Dyn **219**(2): 143-154.
- Liu, I. S., J. D. Chen, L. Ploder, D. Vidgen, D. van der Kooy, V. I. Kalnins and R. R. McInnes (1994). "Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer." Neuron **13**(2): 377-393.
- Liu, Y. C., A. L. Couzens, A. R. Deshwar, B. M.-C. LD, X. Zhang, V. Puviindran, I. C. Scott, A. C. Gingras, C. C. Hui and S. Angers (2014). "The PPFIA1-PP2A protein complex promotes trafficking of Kif7 to the ciliary tip and Hedgehog signaling." Sci Signal **7**(355): ra117.
- Livesey, F. J. and C. L. Cepko (2001). "Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina." Nat Rev Neurosci **2**(2): 109-118.
- Lu, B., L. Ackerman, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1999). "Modes of protein movement that lead to the asymmetric localization of partner of Numb during Drosophila neuroblast division." Mol Cell **4**(6): 883-891.
- Lu, B., M. Rothenberg, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1998). "Partner of Numb colocalizes with Numb during mitosis and directs Numb asymmetric localization in Drosophila neural and muscle progenitors." Cell **95**(2): 225-235.
- Lu, M. S. and C. A. Johnston (2013). "Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells." Development **140**(9): 1843-1856.
- Lu, M. S. and K. E. Prehoda (2013). "A NudE/14-3-3 pathway coordinates dynein and the kinesin Khc73 to position the mitotic spindle." Dev Cell **26**(4): 369-380.
- Luers, G. H., M. Michels, U. Schwaab and T. Franz (2002). "Murine calmodulin binding protein 1 (Calmbp1): tissue-specific expression during development and in adult tissues." Mech Dev **118**(1-2): 229-232.
- Luz, M. and E. Knust (2013). "Fluorescently tagged Lin7c is a dynamic marker for polarity maturation in the zebrafish retinal epithelium." Biol Open **2**(9): 867-871.
- MacNeil, M. A. and R. H. Masland (1998). "Extreme diversity among amacrine cells: implications for function." Neuron **20**(5): 971-982.
- Makarova, O., M. H. Roh, C. J. Liu, S. Laurinec and B. Margolis (2003). "Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1)." Gene **302**(1-2): 21-29.

Mao, L., W. Sun, W. Li, J. Cui, J. Zhang, R. Xing and Y. Lu (2014). "Cell cycle-dependent expression of p42.3 promotes mitotic progression in malignant transformed cells." Mol Carcinog **53**(5): 337-348.

Margolis, B. and J. P. Borg (2005). "Apicobasal polarity complexes." J Cell Sci **118**(Pt 22): 5157-5159.

Marquardt, T. (2003). "Transcriptional control of neuronal diversification in the retina." Progress in Retinal and Eye Research **22**(5): 567-577.

Marquardt, T., R. Ashery-Padan, N. Andrejewski, R. Scardigli, F. Guillemot and P. Gruss (2001). "Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells." Cell **105**(1): 43-55.

Marquardt, T. and P. Gruss (2002). "Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all." Trends Neurosci **25**(1): 32-38.

Marthiens, V. and C. ffrench-Constant (2009). "Adherens junction domains are split by asymmetric division of embryonic neural stem cells." EMBO Rep **10**(5): 515-520.

Martin-Belmonte, F., A. Gassama, A. Datta, W. Yu, U. Rescher, V. Gerke and K. Mostov (2007). "PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42." Cell **128**(2): 383-397.

Martin-Belmonte, F. and M. Perez-Moreno (2011). "Epithelial cell polarity, stem cells and cancer." Nat Rev Cancer **12**(1): 23-38.

Martins, R. A. and R. A. Pearson (2008). "Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina." Brain Res **1192**: 37-60.

Matsumura, S., M. Hamasaki, T. Yamamoto, M. Ebisuya, M. Sato, E. Nishida and F. Toyoshima (2012). "ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin." Nat Commun **3**: 626.

Mattar, P., J. Ericson, S. Blackshaw and M. Cayouette (2015). "A conserved regulatory logic controls temporal identity in mouse neural progenitors." Neuron **85**(3): 497-504.

McConnell, S. K. (1989). "The determination of neuronal fate in the cerebral cortex." Trends Neurosci **12**(9): 342-349.

McKenney, R. J., S. J. Weil, J. Scherer and R. B. Vallee (2011). "Mutually exclusive cytoplasmic dynein regulation by NudE-Lis1 and dynactin." J Biol Chem **286**(45): 39615-39622.

Mears, A. J., M. Kondo, P. K. Swain, Y. Takada, R. A. Bush, T. L. Saunders, P. A. Sieving and A. Swaroop (2001). "Nrl is required for rod photoreceptor development." Nat Genet **29**(4): 447-452.

Medioni, C., K. Mowry and F. Besse (2012). "Principles and roles of mRNA localization in animal development." Development **139**(18): 3263-3276.

Merdes, A., K. Ramyar, J. D. Vechio and D. W. Cleveland (1996). "A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly." Cell **87**(3): 447-458.

Meyer, J. S., R. L. Shearer, E. E. Capowski, L. S. Wright, K. A. Wallace, E. L. McMillan, S. C. Zhang and D. M. Gamm (2009). "Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(39): 16698-16703.

Michel, D., J. P. Arsanto, D. Massey-Harroche, C. Beclin, J. Wijnholds and A. Le Bivic (2005). "PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells." J Cell Sci **118**(Pt 17): 4049-4057.

Minc, N., D. Burgess and F. Chang (2011). "Influence of cell geometry on division-plane positioning." Cell **144**(3): 414-426.

Mochizuki, N., G. Cho, B. Wen and P. A. Insel (1996). "Identification and cDNA cloning of a novel human mosaic protein, LGN, based on interaction with G alpha i2." Gene **181**(1-2): 39-43.

Moon, H. M., Y. H. Youn, H. Pemble, J. Yingling, T. Wittmann and A. Wynshaw-Boris (2014). "LIS1 controls mitosis and mitotic spindle organization via the LIS1-NDEL1-dynein complex." Hum Mol Genet **23**(2): 449-466.

Morin, X. and Y. Bellaïche (2011). "Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development." Dev Cell **21**(1): 102-119.

Morin, X., F. Jaouen and P. Durbec (2007). "Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium." Nat Neurosci **10**(11): 1440-1448.

Morrison, S. J. and A. C. Spradling (2008). "Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life." Cell **132**(4): 598-611.

Morrow, E. M., T. Furukawa, J. E. Lee and C. L. Cepko (1999). "NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent." Development **126**(1): 23-36.

Mu, X., X. Fu, H. Sun, S. Liang, H. Maeda, L. J. Frishman and W. H. Klein (2005). "Ganglion cells are required for normal progenitor- cell proliferation but not cell-fate determination or patterning in the developing mouse retina." Curr Biol **15**(6): 525-530.

Murata, T., K. Furushima, M. Hirano, H. Kiyonari, M. Nakamura, Y. Suda and S. Aizawa (2004). "ang is a novel gene expressed in early neuroectoderm, but its null mutant exhibits no obvious phenotype." Gene Expr Patterns **5**(2): 171-178.

Nair, K. S., A. Mendez, J. B. Blumer, D. H. Rosenzweig and V. Z. Slepak (2005). "The presence of a Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN), a putative binding partner of transducin, in ROD photoreceptors." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(1): 383-389.

Nakajima, Y., E. J. Meyer, A. Kroesen, S. A. McKinney and M. C. Gibson (2013). "Epithelial junctions maintain tissue architecture by directing planar spindle orientation." Nature **500**(7462): 359-362.

Nguyen-Ngoc, T., K. Afshar and P. Gonczy (2007). "Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*." Nat Cell Biol **9**(11): 1294-1302.

Nigg, E. A. and T. Stearns (2011). "The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries." Nat Cell Biol **13**(10): 1154-1160.

Nipper, R. W., K. H. Siller, N. R. Smith, C. Q. Doe and K. E. Prehoda (2007). "Galphai generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(36): 14306-14311.

Noatynska, A., M. Gotta and P. Meraldi (2012). "Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: cause or consequence?" J Cell Biol **199**(7): 1025-1035.

Noctor, S. C., A. C. Flint, T. A. Weissman, W. S. Wong, B. K. Clinton and A. R. Kriegstein (2002). "Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia." J Neurosci **22**(8): 3161-3173.

Noctor, S. C., V. Martinez-Cerdeno and A. R. Kriegstein (2008). "Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis." J Comp Neurol **508**(1): 28-44.

Novorol, C., J. Burkhardt, K. J. Wood, A. Iqbal, C. Roque, N. Coutts, A. D. Almeida, J. He, C. J. Wilkinson and W. A. Harris (2013). "Microcephaly models in the developing zebrafish retinal neuroepithelium point to an underlying defect in metaphase progression." Open Biol **3**(10): 130065.

O'Connell, C. B. and Y. L. Wang (2000). "Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion." Mol Biol Cell **11**(5): 1765-1774.

Oh, E. C., N. Khan, E. Novelli, H. Khanna, E. Strettoi and A. Swaroop (2007). "Transformation of cone precursors to functional rod photoreceptors by bZIP transcription factor NRL." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(5): 1679-1684.

Ohsawa, R. and R. Kageyama (2008). "Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors." Brain Res **1192**: 90-98.

Ohshiro, T., T. Yagami, C. Zhang and F. Matsuzaki (2000). "Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of *Drosophila* neuroblast." Nature **408**(6812): 593-596.

Okano, T., D. Kojima, Y. Fukada, Y. Shichida and T. Yoshizawa (1992). "Primary structures of chicken cone visual pigments: vertebrate rhodopsins have evolved out of cone visual pigments." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 5932-5936.

Ooto, S., T. Akagi, R. Kageyama, J. Akita, M. Mandai, Y. Honda and M. Takahashi (2004). "Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(37): 13654-13659.

- Oppenheim, R. W. (1991). "Cell death during development of the nervous system." Annu Rev Neurosci **14**: 453-501.
- Panbianco, C., D. Weinkove, E. Zanin, D. Jones, N. Divecha, M. Gotta and J. Ahringer (2008). "A casein kinase 1 and PAR proteins regulate asymmetry of a PIP(2) synthesis enzyme for asymmetric spindle positioning." Dev Cell **15**(2): 198-208.
- Park, D. H. and L. S. Rose (2008). "Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning." Dev Biol **315**(1): 42-54.
- Parmentier, M. L., D. Woods, S. Greig, P. G. Phan, A. Radovic, P. Bryant and C. J. O'Kane (2000). "Rapsynoid/partner of inscuteable controls asymmetric division of larval neuroblasts in Drosophila." J Neurosci **20**(14): RC84.
- Pawletz, N. (2001). "Walther Flemming: pioneer of mitosis research." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 72-75.
- Pawlisz, A. S., C. Mutch, A. Wynshaw-Boris, A. Chenn, C. A. Walsh and Y. Feng (2008). "Lis1-Nde1-dependent neuronal fate control determines cerebral cortical size and lamination." Hum Mol Genet **17**(16): 2441-2455.
- Pearson, B. J. and C. Q. Doe (2003). "Regulation of neuroblast competence in Drosophila." Nature **425**(6958): 624-628.
- Pearson, B. J. and C. Q. Doe (2004). "Specification of temporal identity in the developing nervous system." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 619-647.
- Pearson, R. A. (2014). "Advances in repairing the degenerate retina by rod photoreceptor transplantation." Biotechnol Adv **32**(2): 485-491.
- Pellettieri, J. and G. Seydoux (2002). "Anterior-posterior polarity in C. elegans and Drosophila--PARallels and differences." Science **298**(5600): 1946-1950.
- Peng, C. Y., L. Manning, R. Albertson and C. Q. Doe (2000). "The tumour-suppressor genes lgl and dlg regulate basal protein targeting in Drosophila neuroblasts." Nature **408**(6812): 596-600.
- Perron, M., S. Boy, M. A. Amato, A. Viczian, K. Koebernick, T. Pieler and W. A. Harris (2003). "A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation." Development **130**(8): 1565-1577.
- Petersen, P. H., K. Zou, J. K. Hwang, Y. N. Jan and W. Zhong (2002). "Progenitor cell maintenance requires numb and numblake during mouse neurogenesis." Nature **419**(6910): 929-934.
- Petronczki, M. and J. A. Knoblich (2001). "DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in Drosophila." Nat Cell Biol **3**(1): 43-49.

Peyre, E., F. Jaouen, M. Saadaoui, L. Haren, A. Merdes, P. Durbec and X. Morin (2011). "A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells." J Cell Biol **193**(1): 141-154.

Peyre, E. and X. Morin (2012). "An oblique view on the role of spindle orientation in vertebrate neurogenesis." Dev Growth Differ **54**(3): 287-305.

Pichard, V., N. Provost, A. Mendes-Madeira, L. Libeau, P. Hulin, K. T. Tshilenge, M. Biget, B. Ameline, J. Y. Deschamps, M. Weber, G. Le Meur, M. A. Colle, P. Moullier and F. Rolling (2016). "AAV-mediated Gene Therapy Halts Retinal Degeneration in PDE6beta-deficient Dogs." Mol Ther **24**(5): 867-876.

Poche, R. A., Y. Furuta, M. C. Chaboissier, A. Schedl and R. R. Behringer (2008). "Sox9 is expressed in mouse multipotent retinal progenitor cells and functions in Muller glial cell development." J Comp Neurol **510**(3): 237-250.

Poche, R. A., K. M. Kwan, M. A. Raven, Y. Furuta, B. E. Reese and R. R. Behringer (2007). "Lim1 is essential for the correct laminar positioning of retinal horizontal cells." J Neurosci **27**(51): 14099-14107.

Poggi, L., M. Vitorino, I. Masai and W. A. Harris (2005). "Influences on neural lineage and mode of division in the zebrafish retina in vivo." J Cell Biol **171**(6): 991-999.

Ponting, C. and A. P. Jackson (2005). "Evolution of primary microcephaly genes and the enlargement of primate brains." Curr Opin Genet Dev **15**(3): 241-248.

Postiglione, M. P., C. Juschke, Y. Xie, G. A. Haas, C. Charalambous and J. A. Knoblich (2011). "Mouse invertebrate induces apical-basal spindle orientation to facilitate intermediate progenitor generation in the developing neocortex." Neuron **72**(2): 269-284.

Poulson, N. D. and T. Lechler (2010). "Robust control of mitotic spindle orientation in the developing epidermis." J Cell Biol **191**(5): 915-922.

Price, J. and L. Thurlow (1988). "Cell lineage in the rat cerebral cortex: a study using retroviral-mediated gene transfer." Development **104**(3): 473-482.

Price, J., D. Turner and C. Cepko (1987). "Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(1): 156-160.

Qian, X., S. K. Goderie, Q. Shen, J. H. Stern and S. Temple (1998). "Intrinsic programs of patterned cell lineages in isolated vertebrate CNS ventricular zone cells." Development **125**(16): 3143-3152.

Qian, X., Q. Shen, S. K. Goderie, W. He, A. Capela, A. A. Davis and S. Temple (2000). "Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells." Neuron **28**(1): 69-80.

- Qiu, F., H. Jiang and M. Xiang (2008). "A comprehensive negative regulatory program controlled by Brn3b to ensure ganglion cell specification from multipotential retinal precursors." J Neurosci **28**(13): 3392-3403.
- Quiring, R., U. Walldorf, U. Kloter and W. J. Gehring (1994). "Homology of the eyeless gene of Drosophila to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans." Science **265**(5173): 785-789.
- Quyn, A. J., P. L. Appleton, F. A. Carey, R. J. Steele, N. Barker, H. Clevers, R. A. Ridgway, O. J. Sansom and I. S. Nathke (2010). "Spindle orientation bias in gut epithelial stem cell compartments is lost in precancerous tissue." Cell Stem Cell **6**(2): 175-181.
- Raji, B., A. Dansault, V. Vieira, G. de la Houssaye, E. Lacassagne, A. Kobetz, L. Arbogast, J. L. Dufier, J. B. Blumer, M. Menasche and M. Abitbol (2008). "Analysis of partner of inscuteable (mPins) expression in the developing mouse eye." Mol Vis **14**: 2575-2596.
- Rapaport, D. H. and R. I. Dorsky (1998). "Inductive competence, its significance in retinal cell fate determination and a role for Delta-Notch signaling." Semin Cell Dev Biol **9**(3): 241-247.
- Rapaport, D. H., P. Rakic and M. M. LaVail (1996). "Spatiotemporal gradients of cell genesis in the primate retina." Perspect Dev Neurobiol **3**(3): 147-159.
- Rapaport, D. H., L. L. Wong, E. D. Wood, D. Yasumura and M. M. LaVail (2004). "Timing and topography of cell genesis in the rat retina." J Comp Neurol **474**(2): 304-324.
- Raymond, P. A., L. K. Barthel, R. L. Bernardos and J. J. Perkowski (2006). "Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish." BMC Dev Biol **6**: 36.
- Rebollo, E., P. Sampaio, J. Januschke, S. Llamazares, H. Varmark and C. Gonzalez (2007). "Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing Drosophila neural stem cells." Dev Cell **12**(3): 467-474.
- Reh, T. A. and I. J. Kljavin (1989). "Age of differentiation determines rat retinal germinal cell phenotype: induction of differentiation by dissociation." J Neurosci **9**(12): 4179-4189.
- Reiner, O., R. Carrozzo, Y. Shen, M. Wehnert, F. Faustinella, W. B. Dobyns, C. T. Caskey and D. H. Ledbetter (1993). "Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats." Nature **364**(6439): 717-721.
- Rhyu, M. S., L. Y. Jan and Y. N. Jan (1994). "Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells." Cell **76**(3): 477-491.
- Rodriguez-Fraticelli, A. E., S. Vergarajauregui, D. J. Eastburn, A. Datta, M. A. Alonso, K. Mostov and F. Martin-Belmonte (2010). "The Cdc42 GEF Intersectin 2 controls mitotic spindle orientation to form the lumen during epithelial morphogenesis." J Cell Biol **189**(4): 725-738.
- Roegiers, F. and Y. N. Jan (2004). "Asymmetric cell division." Curr Opin Cell Biol **16**(2): 195-205.

Roegiers, F., S. Younger-Shepherd, L. Y. Jan and Y. N. Jan (2001). "Two types of asymmetric divisions in the *Drosophila* sensory organ precursor cell lineage." Nat Cell Biol **3**(1): 58-67.

Roh, M. H., S. Fan, C. J. Liu and B. Margolis (2003). "The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells." J Cell Sci **116**(Pt 14): 2895-2906.

Roh, M. H., O. Makarova, C. J. Liu, K. Shin, S. Lee, S. Laurinec, M. Goyal, R. Wiggins and B. Margolis (2002). "The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost." J Cell Biol **157**(1): 161-172.

Rolls, M. M., R. Albertson, H. P. Shih, C. Y. Lee and C. Q. Doe (2003). "Drosophila aPKC regulates cell polarity and cell proliferation in neuroblasts and epithelia." J Cell Biol **163**(5): 1089-1098.

Roubinet, C. and C. Cabernard (2014). "Control of asymmetric cell division." Curr Opin Cell Biol **31**: 84-91.

Rusan, N. M. and M. Peifer (2007). "A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division." J Cell Biol **177**(1): 13-20.

Saadaoui, M., M. Machicoane, F. di Pietro, F. Etoc, A. Echard and X. Morin (2014). "Dlg1 controls planar spindle orientation in the neuroepithelium through direct interaction with LGN." J Cell Biol **206**(6): 707-717.

Sanada, K. and L. H. Tsai (2005). "G protein betagamma subunits and AGS3 control spindle orientation and asymmetric cell fate of cerebral cortical progenitors." Cell **122**(1): 119-131.

Sanchez, I. and B. D. Dynlacht (2005). "New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control." Semin Cell Dev Biol **16**(3): 311-321.

Sardar, H. S., V. G. Luczak, M. M. Lopez, B. C. Lister and S. P. Gilbert (2010). "Mitotic kinesin CENP-E promotes microtubule plus-end elongation." Curr Biol **20**(18): 1648-1653.

Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M. J. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris and S. Hirotsune (2000). "A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system." Neuron **28**(3): 681-696.

Saunders, R. D., M. C. Avides, T. Howard, C. Gonzalez and D. M. Glover (1997). "The *Drosophila* gene abnormal spindle encodes a novel microtubule-associated protein that associates with the polar regions of the mitotic spindle." J Cell Biol **137**(4): 881-890.

Sauer, F. C. (1935). "Mitosis in the neural tube". J of Comparative Neurology **62**: 377-405.

Sawa, H. (2012). "Control of cell polarity and asymmetric division in *C. elegans*." Curr Top Dev Biol **101**: 55-76.

Schaefer, M. and J. A. Knoblich (2001). "Protein localization during asymmetric cell division." Exp Cell Res **271**(1): 66-74.

Schaefer, M., M. Petronczki, D. Dorner, M. Forte and J. A. Knoblich (2001). "Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the Drosophila nervous system." Cell **107**(2): 183-194.

Schaefer, M., A. Shevchenko, A. Shevchenko and J. A. Knoblich (2000). "A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in Drosophila." Curr Biol **10**(7): 353-362.

Schober, M., M. Schaefer and J. A. Knoblich (1999). "Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in Drosophila neuroblasts." Nature **402**(6761): 548-551.

Schweisguth, F. (2004). "Regulation of notch signaling activity." Curr Biol **14**(3): R129-138.

Segalen, M. and Y. Bellaïche (2009). "Cell division orientation and planar cell polarity pathways." Semin Cell Dev Biol **20**(8): 972-977.

Segalen, M., C. A. Johnston, C. A. Martin, J. G. Dumortier, K. E. Prehoda, N. B. David, C. Q. Doe and Y. Bellaïche (2010). "The Fz-Dsh planar cell polarity pathway induces oriented cell division via Mud/NuMA in Drosophila and zebrafish." Dev Cell **19**(5): 740-752.

Seldin, L., A. Muroyama and T. Lechler (2016). "NuMA-microtubule interactions are critical for spindle orientation and the morphogenesis of diverse epidermal structures." Elife **5**.

Seldin, L., N. D. Poulson, H. P. Foote and T. Lechler (2013). "NuMA localization, stability, and function in spindle orientation involve 4.1 and Cdk1 interactions." Mol Biol Cell **24**(23): 3651-3662.

Sheedlo, H. J. and J. E. Turner (1996). "Effects of retinal pigment epithelial cell-secreted factors on neonatal rat retinal explant progenitor cells." J Neurosci Res **44**(6): 519-531.

Shen, Q., W. Zhong, Y. N. Jan and S. Temple (2002). "Asymmetric Numb distribution is critical for asymmetric cell division of mouse cerebral cortical stem cells and neuroblasts." Development **129**(20): 4843-4853.

Shin, K., S. Straight and B. Margolis (2005). "PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells." J Cell Biol **168**(5): 705-711.

Shitamukai, A., D. Konno and F. Matsuzaki (2011). "Oblique radial glial divisions in the developing mouse neocortex induce self-renewing progenitors outside the germinal zone that resemble primate outer subventricular zone progenitors." J Neurosci **31**(10): 3683-3695.

Shu, T., H. C. Tseng, T. Sapir, P. Stern, Y. Zhou, K. Sanada, A. Fischer, F. M. Coquelle, O. Reiner and L. H. Tsai (2006). "Doublecortin-like kinase controls neurogenesis by regulating mitotic spindles and M phase progression." Neuron **49**(1): 25-39.

Sicinski, P., J. L. Donaher, S. B. Parker, T. Li, A. Fazeli, H. Gardner, S. Z. Haslam, R. T. Bronson, S. J. Elledge and R. A. Weinberg (1995). "Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast." Cell **82**(4): 621-630.

Sidman, R. L. (1961). "Histogenesis of mouse retina studied with thymidine-H3." In: Smelser GK, editor. *The Structure of the Eye*. pp. 487-506.

Siegrist, S. E. and C. Q. Doe (2005). "Microtubule-induced Pins/Galphai cortical polarity in *Drosophila* neuroblasts." *Cell* **123**(7): 1323-1335.

Siller, K. H., C. Cabernard and C. Q. Doe (2006). "The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts." *Nat Cell Biol* **8**(6): 594-600.

Siller, K. H. and C. Q. Doe (2008). "Lis1/dynaactin regulates metaphase spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts." *Dev Biol* **319**(1): 1-9.

Siller, K. H. and C. Q. Doe (2009). "Spindle orientation during asymmetric cell division." *Nat Cell Biol* **11**(4): 365-374.

Silva, A. O., C. E. Ercole and S. C. McLoon (2002). "Plane of cell cleavage and numb distribution during cell division relative to cell differentiation in the developing retina." *J Neurosci* **22**(17): 7518-7525.

Simons, B. D. and H. Clevers (2011). "Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues." *Cell* **145**(6): 851-862.

Slezak, M., C. Goritz, A. Niemiec, J. Frisen, P. Chambon, D. Metzger and F. W. Pfrieger (2007). "Transgenic mice for conditional gene manipulation in astroglial cells." *Glia* **55**(15): 1565-1576.

Sottocornola, R., C. Royer, V. Vives, L. Tordella, S. Zhong, Y. Wang, I. Ratnayaka, M. Shipman, A. Cheung, C. Gaston-Massuet, P. Ferretti, Z. Molnar and X. Lu (2010). "ASPP2 binds Par-3 and controls the polarity and proliferation of neural progenitors during CNS development." *Dev Cell* **19**(1): 126-137.

Sousa-Nunes, R., L. Y. Cheng and A. P. Gould (2010). "Regulating neural proliferation in the *Drosophila* CNS." *Curr Opin Neurobiol* **20**(1): 50-57.

Spana, E. P. and C. Q. Doe (1995). "The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*." *Development* **121**(10): 3187-3195.

Spana, E. P., C. Kopczynski, C. S. Goodman and C. Q. Doe (1995). "Asymmetric localization of numb autonomously determines sibling neuron identity in the *Drosophila* CNS." *Development* **121**(11): 3489-3494.

Speicher, S., A. Fischer, J. Knoblich and A. Carmena (2008). "The PDZ protein Canoe regulates the asymmetric division of *Drosophila* neuroblasts and muscle progenitors." *Curr Biol* **18**(11): 831-837.

Spemann, H. and H. Mangold (2001). "Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. 1923." *Int J Dev Biol* **45**(1): 13-38.

Srinivasan, D. G., R. M. Fisk, H. Xu and S. van den Heuvel (2003). "A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signaling and spindle function in *C. elegans*." *Genes Dev* **17**(10): 1225-1239.

Srinivasan, K., J. Roosa, O. Olsen, S. H. Lee, D. S. Bredt and S. K. McConnell (2008). "MAL3-3 regulates polarity and early neurogenesis in the developing cerebral cortex." Development **135**(10): 1781-1790.

Stehman, S. A., Y. Chen, R. J. McKenney and R. B. Vallee (2007). "NudE and NudEL are required for mitotic progression and are involved in dynein recruitment to kinetochores." J Cell Biol **178**(4): 583-594.

Stohr, H., L. L. Molday, R. S. Molday, B. H. Weber, B. Biedermann, A. Reichenbach and F. Kramer (2005). "Membrane-associated guanylate kinase proteins MPP4 and MPP5 associate with Veli3 at distinct intercellular junctions of the neurosensory retina." J Comp Neurol **481**(1): 31-41.

Straight, S. W., L. Chen, D. Karnak and B. Margolis (2001). "Interaction with mLin-7 alters the targeting of endocytosed transmembrane proteins in mammalian epithelial cells." Mol Biol Cell **12**(5): 1329-1340.

Straight, S. W., K. Shin, V. C. Fogg, S. Fan, C. J. Liu, M. Roh and B. Margolis (2004). "Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects." Mol Biol Cell **15**(4): 1981-1990.

Sun, W., W. W. Dong, L. L. Mao, W. M. Li, J. T. Cui, R. Xing and Y. Y. Lu (2013). "Overexpression of p42.3 promotes cell growth and tumorigenicity in hepatocellular carcinoma." World J Gastroenterol **19**(19): 2913-2920.

Suzuki, A. and S. Ohno (2006). "The PAR-aPKC system: lessons in polarity." J Cell Sci **119**(Pt 6): 979-987.

Swaroop, A., D. Kim and D. Forrester (2010). "Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina." Nat Rev Neurosci **11**(8): 563-576.

Tabuse, Y., Y. Izumi, F. Piano, K. J. Kemphues, J. Miwa and S. Ohno (1998). "Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*." Development **125**(18): 3607-3614.

Takai, Y. and H. Nakanishi (2003). "Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions." J Cell Sci **116**(Pt 1): 17-27.

Takesono, A., M. J. Cismowski, C. Ribas, M. Bernard, P. Chung, S. Hazard, 3rd, E. Duzic and S. M. Lanier (1999). "Receptor-independent activators of heterotrimeric G-protein signaling pathways." J Biol Chem **274**(47): 33202-33205.

Tanentzapf, G. and U. Tepass (2003). "Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization." Nat Cell Biol **5**(1): 46-52.

Tarchini, B., C. Jolicoeur and M. Cayouette (2012). "In vivo evidence for unbiased Ikaros retinal lineages using an Ikaros-Cre mouse line driving clonal recombination." Dev Dyn **241**(12): 1973-1985.

Tarchini, B., C. Jolicoeur and M. Cayouette (2013). "A molecular blueprint at the apical surface establishes planar asymmetry in cochlear hair cells." Dev Cell **27**(1): 88-102.

Tepass, U., C. Theres and E. Knust (1990). "crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia." Cell **61**(5): 787-799.

They, M. and M. Bornens (2006). "Cell shape and cell division." Curr Opin Cell Biol **18**(6): 648-657.

Tibber, M. S., I. Kralj-Hans, J. Savage, P. G. Mobbs and G. Jeffery (2004). "The orientation and dynamics of cell division within the plane of the developing vertebrate retina." European Journal of Neuroscience **19**(3): 497-504.

Trimarchi, J. M., M. B. Stadler and C. L. Cepko (2008). "Individual retinal progenitor cells display extensive heterogeneity of gene expression." PLoS One **3**(2): e1588.

Turner, D. L. and C. L. Cepko (1987). "A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development." Nature **328**(6126): 131-136.

Turner, D. L., E. Y. Snyder and C. L. Cepko (1990). "Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina." Neuron **4**(6): 833-845.

Uemura, T., S. Shepherd, L. Ackerman, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1989). "numb, a gene required in determination of cell fate during sensory organ formation in Drosophila embryos." Cell **58**(2): 349-360.

van den Hurk, J. A., P. Rashbass, R. Roepman, J. Davis, K. E. Voeselek, M. L. Arends, M. N. Zonneveld, M. H. van Roekel, K. Cameron, K. Rohrschneider, J. R. Heckenlively, R. K. Koenekoop, C. B. Hoyng, F. P. Cremers and A. I. den Hollander (2005). "Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis." Mol Vis **11**: 263-273.

van Rossum, A. G., W. M. Aartsen, J. Meuleman, J. Klooster, A. Malysheva, I. Versteeg, J. P. Arsanto, A. Le Bivic and J. Wijnholds (2006). "Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells." Hum Mol Genet **15**(18): 2659-2672.

Vecino, E., M. Hernandez and M. Garcia (2004). "Cell death in the developing vertebrate retina." Int J Dev Biol **48**(8-9): 965-974.

Vecino, E., F. D. Rodriguez, N. Ruzafa, X. Pereiro and S. C. Sharma (2016). "Glia-neuron interactions in the mammalian retina." Prog Retin Eye Res **51**: 1-40.

Velichutina, I., R. Shaknovich, H. Geng, N. A. Johnson, R. D. Gascoyne, A. M. Melnick and O. Elemento (2010). "EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis." Blood **116**(24): 5247-5255.

Verdi, J. M., R. Schmandt, A. Bashirullah, S. Jacob, R. Salvino, C. G. Craig, A. E. Program, H. D. Lipshitz and C. J. McGlade (1996). "Mammalian NUMB is an evolutionarily conserved signaling adapter protein that specifies cell fate." Curr Biol **6**(9): 1134-1145.

Vetter, M. L. and N. L. Brown (2001). "The role of basic helix-loop-helix genes in vertebrate retinogenesis." Semin Cell Dev Biol **12**(6): 491-498.

Vives, V., J. Su, S. Zhong, I. Ratnayaka, E. Slee, R. Goldin and X. Lu (2006). "ASPP2 is a haploinsufficient tumor suppressor that cooperates with p53 to suppress tumor growth." Genes Dev **20**(10): 1262-1267.

Voyvodic, J. T., J. F. Burne and M. C. Raff (1995). "Quantification of normal cell death in the rat retina: implications for clone composition in cell lineage analysis." Eur J Neurosci **7**(12): 2469-2478.

Wakefield, J. G., S. Bonaccorsi and M. Gatti (2001). "The drosophila protein asp is involved in microtubule organization during spindle formation and cytokinesis." J Cell Biol **153**(4): 637-648.

Wall, D. S., A. J. Mears, B. McNeill, C. Mazerolle, S. Thurig, Y. Wang, R. Kageyama and V. A. Wallace (2009). "Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity." J Cell Biol **184**(1): 101-112.

Wallace, V. A. (2008). "Proliferative and cell fate effects of Hedgehog signaling in the vertebrate retina." Brain Res **1192**: 61-75.

Wan, W., X. Xu, G. Jia, W. Li, J. Wang, T. Ren, Z. Wu, J. Zhang, L. Zhang and Y. Lu (2014). "Differential expression of p42.3 in low- and high-grade gliomas." World J Surg Oncol **12**: 185.

Wang, H., K. H. Ng, H. Qian, D. P. Siderovski, W. Chia and F. Yu (2005). "Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins." Nat Cell Biol **7**(11): 1091-1098.

Wang, S. W., B. S. Kim, K. Ding, H. Wang, D. Sun, R. L. Johnson, W. H. Klein and L. Gan (2001). "Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells." Genes Dev **15**(1): 24-29.

Wang, X., J. W. Tsai, J. H. Imai, W. N. Lian, R. B. Vallee and S. H. Shi (2009). "Asymmetric centrosome inheritance maintains neural progenitors in the neocortex." Nature **461**(7266): 947-955.

Wang, X., J. W. Tsai, B. LaMonica and A. R. Kriegstein (2011). "A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex." Nat Neurosci **14**(5): 555-561.

Wang, Y., G. D. Dakubo, S. Thurig, C. J. Mazerolle and V. A. Wallace (2005). "Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina." Development **132**(22): 5103-5113.

Warrant, E. J. (2015). "Photoreceptor evolution: ancient 'cones' turn out to be rods." Curr Biol **25**(4): R148-151.

Watanabe, T. and M. C. Raff (1990). "Rod photoreceptor development in vitro: intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina." Neuron **4**(3): 461-467.

Watts, J. L., B. Etemad-Moghadam, S. Guo, L. Boyd, B. W. Draper, C. C. Mello, J. R. Priess and K. J. Kemphues (1996). "par-6, a gene involved in the establishment of asymmetry in early *C. elegans* embryos, mediates the asymmetric localization of PAR-3." Development **122**(10): 3133-3140.

Wee, B., C. A. Johnston, K. E. Prehoda and C. Q. Doe (2011). "Canoe binds RanGTP to promote Pins(TPR)/Mud-mediated spindle orientation." J Cell Biol **195**(3): 369-376.

Wei, X., Y. Luo and D. R. Hyde (2006). "Molecular cloning of three zebrafish *lin7* genes and their expression patterns in the retina." Exp Eye Res **82**(1): 122-131.

Weng, Y. R., Y. N. Yu, L. L. Ren, Y. Cui, Y. Y. Lu, H. Y. Chen, X. Ma, W. X. Qin, W. Cao, J. Hong and J. Y. Fang (2014). "Role of C9orf140 in the promotion of colorectal cancer progression and mechanisms of its upregulation via activation of STAT5, beta-catenin and EZH2." Carcinogenesis **35**(6): 1389-1398.

Wetts, R. and S. E. Fraser (1988). "Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina." Science **239**(4844): 1142-1145.

Whitfield, M. L., G. Sherlock, A. J. Saldanha, J. I. Murray, C. A. Ball, K. E. Alexander, J. C. Matese, C. M. Perou, M. M. Hurt, P. O. Brown and D. Botstein (2002). "Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors." Mol Biol Cell **13**(6): 1977-2000.

Willard, F. S., R. J. Kimple and D. P. Siderovski (2004). "Return of the GDI: the GoLoco motif in cell division." Annu Rev Biochem **73**: 925-951.

Williams, S. E., S. Beronja, H. A. Pasolli and E. Fuchs (2011). "Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation." Nature **470**(7334): 353-358.

Williams, S. E., L. A. Ratliff, M. P. Postiglione, J. A. Knoblich and E. Fuchs (2014). "Par3-mInsc and Galphai3 cooperate to promote oriented epidermal cell divisions through LGN." Nat Cell Biol **16**(8): 758-769.

Wilson, A. M., B. Morquette, M. Abdouh, N. Unsain, P. A. Barker, E. Feinstein, G. Bernier and A. Di Polo (2013). "ASPP1/2 regulate p53-dependent death of retinal ganglion cells through PUMA and Fas/CD95 activation in vivo." J Neurosci **33**(5): 2205-2216.

Wodarz, A. (2002). "Establishing cell polarity in development." Nat Cell Biol **4**(2): E39-44.

Wodarz, A., U. Hinz, M. Engelbert and E. Knust (1995). "Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*." Cell **82**(1): 67-76.

- Wodarz, A., A. Ramrath, A. Grimm and E. Knust (2000). "Drosophila atypical protein kinase C associates with Bazooka and controls polarity of epithelia and neuroblasts." J Cell Biol **150**(6): 1361-1374.
- Wodarz, A., A. Ramrath, U. Kuchinke and E. Knust (1999). "Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in Drosophila neuroblasts." Nature **402**(6761): 544-547.
- Woodard, G. E., N. N. Huang, H. Cho, T. Miki, G. G. Tall and J. H. Kehrl (2010). "Ric-8A and Gi alpha recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle." Mol Cell Biol **30**(14): 3519-3530.
- Wu, F., R. Li, Y. Umino, T. J. Kaczynski, D. Sapkota, S. Li, M. Xiang, S. J. Fliesler, D. M. Sherry, M. Gannon, E. Solessio and X. Mu (2013). "Onecut1 is essential for horizontal cell genesis and retinal integrity." J Neurosci **33**(32): 13053-13065, 13065a.
- Xiang, M., L. Zhou, J. P. Macke, T. Yoshioka, S. H. Hendry, R. L. Eddy, T. B. Shows and J. Nathans (1995). "The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4762-4785.
- Xu, X., W. Li, X. Fan, Y. Liang, M. Zhao, J. Zhang, Y. Liang, W. Tong, J. Wang, W. Yang and Y. Lu (2007). "Identification and characterization of a novel p42.3 gene as tumor-specific and mitosis phase-dependent expression in gastric cancer." Oncogene **26**(52): 7371-7379.
- Yamashita, Y. M., A. P. Mahowald, J. R. Perlin and M. T. Fuller (2007). "Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division." Science **315**(5811): 518-521.
- Yingling, J., Y. H. Youn, D. Darling, K. Toyo-Oka, T. Pramparo, S. Hirotsune and A. Wynshaw-Boris (2008). "Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division." Cell **132**(3): 474-486.
- Young, R. W. (1984). "Cell death during differentiation of the retina in the mouse." J Comp Neurol **229**(3): 362-373.
- Young, R. W. (1985). "Cell differentiation in the retina of the mouse." Anat Rec **212**(2): 199-205.
- Young, R. W. (1985). "Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse." Brain Res **353**(2): 229-239.
- Yu, C., C. J. Mazerolle, S. Thurig, Y. Wang, M. Pacal, R. Bremner and V. A. Wallace (2006). "Direct and indirect effects of hedgehog pathway activation in the mammalian retina." Mol Cell Neurosci **32**(3): 274-282.
- Yu, F., C. T. Kuo and Y. N. Jan (2006). "Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology." Neuron **51**(1): 13-20.

Yu, F., X. Morin, Y. Cai, X. Yang and W. Chia (2000). "Analysis of partner of inscuteable, a Novel Player of Drosophila Asymmetric Divisions, Reveals Two Distinct Steps in Inscuteable Apical Localization." Cell **100**(4): 399-409.

Yu, F., X. Morin, R. Kaushik, S. Bahri, X. Yang and W. Chia (2003). "A mouse homologue of Drosophila pins can asymmetrically localize and substitute for pins function in Drosophila neuroblasts." J Cell Sci **116**(Pt 5): 887-896.

Yuan, X. S., Y. Zhang, X. Y. Guan, B. Dong, M. Zhao, L. L. Mao, Y. Y. Lu, X. Y. Tian and C. Y. Hao (2013). "p42.3: a promising biomarker for the progression and prognosis of human colorectal cancer." J Cancer Res Clin Oncol **139**(7): 1211-1220.

Yuzawa, S., S. Kamakura, Y. Iwakiri, J. Hayase and H. Sumimoto (2011). "Structural basis for interaction between the conserved cell polarity proteins Inscuteable and Leu-Gly-Asn repeat-enriched protein (LGN)." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(48): 19210-19215.

Zaghloul, N. A., B. Yan and S. A. Moody (2005). "Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis." Biol Cell **97**(5): 321-337.

Zhang, J., C. Lu, Z. Shang, R. Xing, L. Shi and Y. Lv (2012). "p42.3 gene expression in gastric cancer cell and its protein regulatory network analysis." Theor Biol Med Model **9**(1): 53.

Zhao, L., H. Saitou, X. Sun, K. Shiota and M. Ishibashi (2010). "Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain." Mech Dev **127**(1-2): 62-72.

Zheng, Z., Q. Wan, G. Meixiong and Q. Du (2014). "Cell cycle-regulated membrane binding of NuMA contributes to efficient anaphase chromosome separation." Mol Biol Cell **25**(5): 606-619.

Zheng, Z., H. Zhu, Q. Wan, J. Liu, Z. Xiao, D. P. Siderovski and Q. Du (2010). "LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis." J Cell Biol **189**(2): 275-288.

Zhong, W. and W. Chia (2008). "Neurogenesis and asymmetric cell division." Curr Opin Neurobiol **18**(1): 4-11.

Zhong, W., J. N. Feder, M. M. Jiang, L. Y. Jan and Y. N. Jan (1996). "Asymmetric localization of a mammalian numb homolog during mouse cortical neurogenesis." Neuron **17**(1): 43-53.

Zhong, W., M. M. Jiang, M. D. Schonemann, J. J. Meneses, R. A. Pedersen, L. Y. Jan and Y. N. Jan (2000). "Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6844-6849.

Zhong, X., L. Liu, A. Zhao, G. P. Pfeifer and X. Xu (2005). "The abnormal spindle-like, microcephaly-associated (ASPM) gene encodes a centrosomal protein." Cell Cycle **4**(9): 1227-1229.

Zhu, J., W. Wen, Z. Zheng, Y. Shang, Z. Wei, Z. Xiao, Z. Pan, Q. Du, W. Wang and M. Zhang (2011). "LGN/mInsc and LGN/NuMA complex structures suggest distinct functions in asymmetric cell division for the Par3/mInsc/LGN and Galphai/LGN/NuMA pathways." Mol Cell **43**(3): 418-431.

Zigman, M., M. Cayouette, C. Charalambous, A. Schleiffer, O. Hoeller, D. Dunican, C. R. McCudden, N. Firnberg, B. A. Barres, D. P. Siderovski and J. A. Knoblich (2005). "Mammalian inscuteable regulates spindle orientation and cell fate in the developing retina." Neuron **48**(4): 539-545.

Zilian, O., C. Saner, L. Hagedorn, H. Y. Lee, E. Sauberli, U. Suter, L. Sommer and M. Aguet (2001). "Multiple roles of mouse Numb in tuning developmental cell fates." Curr Biol **11**(7): 494-501.

Zuber, M. E., G. Gestri, A. S. Viczian, G. Barsacchi and W. A. Harris (2003). "Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors." Development **130**(21): 5155-5167.

Zwaal, R. R., J. Ahringer, H. G. van Luenen, A. Rushforth, P. Anderson and R. H. Plasterk (1996). "G proteins are required for spatial orientation of early cell cleavages in *C. elegans* embryos." Cell **86**(4): 619-629.

Annexe 1, supplementary table 1, related to figure 25

Gene ID	Gene name	Pulldown ID: 290 GNAI1 CA (N- Strep-HA-CBP)			Pulldown ID: 293 GNAI1 CA (N- Strep-HA-CBP)		
		Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage	Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage
60626	RIC8A	94	38	66.3	262	44	68
2770	GNAI1	302	28	62.7	440	29	62.7
54504	CPVL	1	1	2.1	68	20	28.4
5909	RAP1GAP	9	9	17.2	10	7	17.3
55970	GNG12	4	2	41.7	5	2	37.5
29899	GPSM2	14	12	29.2	32	14	33.5
26086	GPSM1	44	30	56.1	214	53	73.2
2782	GNB1	20	12	54.1	33	13	56.2
121551	BTBD11	9	8	11.6	25	14	16.5
8239	USP9X	10	9	4.7	16	13	7.6
2070	EYA4	7	7	13.8	2	1	3.7
23108	GARNL4/ RAP1GAP2	7	6	10.3	4	3	6.4
89958	SAPCD2	6	6	20.6	38	14	44
2783	GNB2	4	4	37.4	11	6	46.5
137902	PXDNL	4	1	1.5	3	2	2.2
59345	GNB4	2	2	21.8	1	1	25
2787	GNG5	2	1	39.7	11	4	63.2
552891	LOC552891	2	1	48.5	2	1	22.1
23418	CRB1	1	1	1.4	2	1	1.4
25841	ABTB2	4	4	6.4			
55291	SAPS3	2	2	4.2			

Gene ID	Gene name	Pulldown ID: 392 GNAI1 CA (N- Strep-HA-CBP)			No of pulldowns	Pulldown Frequency
		Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage		
60626	RIC8A	76	20	33.9	3	100
2770	GNAI1	491	12	28.8	3	100
54504	CPVL	24	10	17.6	3	100
5909	RAP1GAP	11	6	14.8	3	100
55970	GNG12	5	1	22.2	3	100
29899	GPSM2	10	5	11.1	3	100
26086	GPSM1	32	14	17.6	3	100
2782	GNB1	19	5	11.2	3	100
121551	BTBD11	8	5	5.8	3	100
8239	USP9X	18	11	5.5	3	100
2070	EYA4	6	3	9.3	3	100
23108	GARNL4/ RAP1GAP2	9	4	9.9	3	100
89958	SAPCD2	9	5	17	3	100
2783	GNB2				2	66.67
137902	PXDNL				2	66.67
59345	GNB4				2	66.67
2787	GNG5				2	66.67
552891	LOC552891				2	66.67
23418	CRB1				2	66.67
25841	ABTB2	3	1	2	2	66.67
55291	SAPS3	6	4	11.3	2	66.67

Annexe 2, supplementary table 2, related to figure 25

Gene ID	Gene name	Pulldown ID: 362 SAPCD2(N-Flag)			Pulldown ID: 346 SAPCD2(N-Flag)		
		Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage	Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage
89958	SAPCD2	207	48	70.40	229	51	83.8
7159	TP53BP2	17	13	20.60	13	11	23.7
222484	LNX2	11	10	17.50	24	15	24.9
23368	PPP1R13B	9	7	9.00	10	9	11.1
51429	SNX9	7	5	10.60	6	5	11.4
26086	GPSM1	6	5	14.60	12	11	27.3
64398	MPP5	4	4	8.70	5	5	13
56288	PARD3	3	3	3.20	9	9	10
7414	VCL	3	3	5.00	4	4	7
284114	TMEM102	4	4	13.40	11	8	23.2
8777	MPDZ	2	2	3.30	10	10	7
117177	RAB3IP				2	2	13.4
7157	TP53				11	8	23.4
10111	RAD50				8	8	9.6
6050	RNH1	5	4	11.30	2	2	6.3
114928	GPRASP2	2	2	3.90	6	4	7.6
11007	CCDC85B	2	2	10.40	1	1	6.4
154796	AMOT	1	1	1.90	2	2	4.4
4361	MRE11A				6	4	9.6
55635	DEPDC1				5	3	7.6
10207	INADL				2	2	2.3
5074	PAWR	1	1	4.70	3	2	17.9
729998	LOC729998	1	1	2.70	2	2	5
55327	LIN7C				3	3	17.3
22824	HSPA4L	2	2	7.20	1	1	7
64746	ACBD3	2	2	5.70			
29899	GPSM2	1	1	4.00	2	2	9.5
54930	C14orf94				2	2	6.1
2101	ESRRA				2	1	5.2
51763	SKIP				1	1	4.3
10687	PNMA2				1	1	6.9
7153	TOP2A				1	1	1
10935	PRDX3				1	1	5.9
3030	HADHA						

Gene ID	Gene name	Pulldown ID: 359 SAPCD2(N-Flag)			Pulldown ID: 343 SAPCD2(N-Flag)		
		Total no. of peptides	No. of unique	% Coverage	Total no. of peptides	No. of unique	% Coverage
89958	SAPCD2	175	52	83.3	181	41	74.3
7159	TP53BP2	19	14	21.1	11	9	15
222484	LNX2	15	12	21.7	19	11	18.3
23368	PPP1R13B	9	9	9.3	6	5	4.7
51429	SNX9	5	5	10.9	5	4	8.6
26086	GPSM1	9	8	19.8	6	5	9.7
64398	MPP5	4	4	8	2	2	3.9
56288	PARD3	11	11	10.3	4	4	3.4
7414	VCL	9	7	9.3	6	4	5.9
284114	TMEM102	4	4	12.2	13	8	27
8777	MPDZ	6	6	4.7	8	7	7.1
117177	RAB3IP	4	4	11.7	3	3	13.8
7157	TP53	4	4	10.9	5	5	17
10111	RAD50	5	5	6.1	2	2	2.4
6050	RNH1	4	4	18.4			
114928	GPRASP2	5	4	7.9			
11007	CCDC85B				3	2	16.8
154796	AMOT	1	1	1.9			
4361	MRE11A	5	5	14.6	3	3	5.6
55635	DEPDC1	2	2	5.9	4	4	12
10207	INADL	3	2	1.8	2	2	1.5
5074	PAWR	1	1	5	4	4	18.8
729998	LOC729998	1	1	2.7			
55327	LIN7C						
22824	HSPA4L				2	2	8.6
64746	ACBD3	2	2	7.4			
29899	GPSM2						
54930	C14orf94	2	1	3.3	2	2	6.1
2101	ESRRA				2	1	5.2
51763	SKIP	2	2	6.2			
10687	PNMA2						
7153	TOP2A				4	3	3.7
10935	PRDX3				2	1	5.9
3030	HADHA	2	2	4.2			

Gene ID	Gene name	Pulldown ID: 347 SAPCD2(N-Flag)			Pulldown ID: 360 SAPCD2(N-Flag)		
		Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage	Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage
89958	SAPCD2	241	51	81.2	151	47	80.5
7159	TP53BP2	18	13	19.5	14	12	16.3
222484	LNX2	13	10	16.1	8	7	15
23368	PPP1R13B	8	8	10.9	8	7	12
51429	SNX9	6	6	15.5	10	8	19.3
26086	GPSM1	9	7	21.3	6	6	14
64398	MPP5	4	4	8	4	4	8.1
56288	PARD3	4	4	3.2	9	9	8.7
7414	VCL	8	6	8.5	3	3	2.8
284114	TMEM102	8	8	21.7	6	4	11.4
8777	MPDZ	9	9	8	5	5	3.9
117177	RAB3IP	4	4	11.6	1	1	7.9
7157	TP53	12	8	19.3	7	6	18.3
10111	RAD50	10	10	10.2	5	5	4.5
6050	RNH1	1	1	3.3	8	8	31
114928	GPRASP2	3	3	6.7			
11007	CCDC85B	3	2	9.9	2	2	9.9
154796	AMOT	7	6	15.3			
4361	MRE11A	11	8	16.8	4	4	5.6
55635	DEPDC1	1	1	3.2	2	2	6.1
10207	INADL	5	5	4.1	5	5	5.3
5074	PAWR						
729998	LOC729998	1	1	2.7			
55327	LIN7C	3	3	14.7	3	3	16.2
22824	HSPA4L				1	1	1.7
64746	ACBD3				3	3	6.8
29899	GPSM2						
54930	C14orf94				2	2	7.4
2101	ESRRA	4	3	14.9			
51763	SKIP	1	1	5.4	2	1	4
10687	PNMA2						
7153	TOP2A	5	4	3.7			
10935	PRDX3	2	2	10.1			
3030	HADHA				3	3	5.4

Gene ID	Gene name	Pulldown ID: 344 SAPCD2(N-Flag)			Pulldown ID: 361 SAPCD2(N-Flag)		
		Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage	Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage
89958	SAPCD2	417	37	52.7	217	51	76.6
7159	TP53BP2	29	14	21.8	13	11	14.6
222484	LNK2	16	7	12.8	4	3	9
23368	PPP1R13B	10	8	9.8	6	6	6.6
51429	SNX9	17	8	17.3	4	4	9.2
26086	GPSM1	11	7	14.9	7	7	18.1
64398	MPP5	5	4	9.8	4	4	8.7
56288	PARD3	2	2	2.7	5	5	4.6
7414	VCL	12	8	12.4	4	3	6.7
284114	TMEM102	3	2	11.6			
8777	MPDZ	9	7	7.8	4	4	4.1
117177	RAB3IP	2	1	4.3	1	1	4.7
7157	TP53	2	2	9.7	2	2	7.4
10111	RAD50	10	9	9	3	3	3.2
6050	RNH1				1	1	3.3
114928	GPRASP2	5	2	4.3	1	1	1.6
11007	CCDC85B						
154796	AMOT	5	5	12.6	1	1	1.9
4361	MRE11A	8	4	9.3			
55635	DEPDC1	9	5	13.7	2	2	5.9
10207	INADL						
5074	PAWR				1	1	5
729998	LOC729998				1	1	2.7
55327	LIN7C				1	1	10.7
22824	HSPA4L						
64746	ACBD3	1	1	2.7			
29899	GPSM2	1	1	3.4	1	1	1.6
54930	C14orf94						
2101	ESRRA						
51763	SKIP						
10687	PNMA2	3	3	9.9	1	1	3
7153	TOP2A				2	2	1.8
10935	PRDX3						
3030	HADHA				6	6	12.7

		Pulldown ID: 345 SAPCD2(N-Flag)				
Gene ID	Gene name	Total no. of peptides	No. of unique peptides	% Coverage	No of pulldowns	Pulldown Frequency
89958	SAPCD2	411	42	53.2	9	100
7159	TP53BP2	33	23	26.8	9	100
222484	LNX2	20	6	16.4	9	100
23368	PPP1R13B	13	9	12.2	9	100
51429	SNX9	2	2	4.2	9	100
26086	GPSM1	3	3	4.9	9	100
64398	MPP5	5	2	5.3	9	100
56288	PARD3	29	21	19.5	9	100
7414	VCL	35	18	24.7	9	100
284114	TMEM102	3	3	14	8	88.89
8777	MPDZ				8	88.89
117177	RAB3IP	4	4	17.7	8	88.89
7157	TP53				7	77.78
10111	RAD50				7	77.78
6050	RNH1				6	66.67
114928	GPRASP2				6	66.67
11007	CCDC85B	4	3	13.9	6	66.67
154796	AMOT				6	66.67
4361	MRE11A				6	66.67
55635	DEPDC1	7	5	8.3	6	66.67
10207	INADL	5	5	5.2	6	66.67
5074	PAWR				5	55.56
729998	LOC729998				5	55.56
55327	LIN7C	2	2	11.7	5	55.56
22824	HSPA4L				4	44.44
64746	ACBD3				4	44.44
29899	GPSM2				4	44.44
54930	C14orf94				4	44.44
2101	ESRRA	2	1	3.8	4	44.44
51763	SKIP				4	44.44
10687	PNMA2	6	5	20.9	4	44.44
7153	TOP2A				4	44.44
10935	PRDX3	4	3	13.9	4	44.44
3030	HADHA	21	14	29.1	4	44.44

Annexe 3, article (Lacomme *et al.* 2016)

© 2016. Published by The Company of Biologists Ltd | Development (2016) 143, 575-581 doi:10.1242/dev.129783



RESEARCH REPORT

The LGN protein promotes planar proliferative divisions in the neocortex but apicobasal asymmetric terminal divisions in the retina

Marine Lacomme¹, Basile Tarchini^{1,*}, Camille Boudreau-Pinsonneault^{1,2}, Carine Monat¹ and Michel Cayouette^{1,2,3,4,†}

ABSTRACT

Cell division orientation is crucial to control segregation of polarized fate determinants in the daughter cells to produce symmetric or asymmetric fate outcomes. Most studies in vertebrates have focused on the role of mitotic spindle orientation in proliferative asymmetric divisions and it remains unclear whether altering spindle orientation is required for the production of asymmetric fates in differentiative terminal divisions. Here, we show that the GoLoco motif protein LGN, which interacts with G α i to control apicobasal division orientation in *Drosophila* neuroblasts, is excluded from the apical domain of retinal progenitors undergoing planar divisions, but not in those undergoing apicobasal divisions. Inactivation of LGN reduces the number of apicobasal divisions in mouse retinal progenitors, whereas it conversely increases these divisions in cortical progenitors. Although LGN inactivation increases the number of progenitors outside the ventricular zone in the developing neocortex, it has no effect on the position or number of progenitors in the retina. Retinal progenitor cell lineage analysis in LGN mutant mice, however, shows an increase in symmetric terminal divisions producing two photoreceptors, at the expense of asymmetric terminal divisions producing a photoreceptor and a bipolar or amacrine cell. Similarly, inactivating G α i decreases asymmetric terminal divisions, suggesting that LGN function with G α i to control division orientation in retinal progenitors. Together, these results show a context-dependent function for LGN and indicate that apicobasal divisions are not involved in proliferative asymmetric divisions in the mouse retina, but are instead essential to generate binary fates at terminal divisions.

KEY WORDS: Asymmetric cell division, Retina, Cell lineage, Oriented divisions, Cell fate decision, Stem cell, Self-renewal, Differentiation

INTRODUCTION

Whereas differential exposure to environmental cues can instruct asymmetric fates, varying mitotic spindle orientation can produce intrinsically asymmetric cell divisions by segregating fate determinants unequally in the daughter cells (Siller and Doe,

2009). Extensive work over the past several years has provided detailed insights on the mechanisms regulating spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts (Gönczy, 2008; Knoblich, 2008; Yu et al., 2006). The polarity protein Par-3 interacts with the adaptor protein Inscuteable (Insc), which, in turn, recruits Partner of Inscuteable (Pins) to the apical cortex. Pins then interacts with cortical G α i-GDP and with the microtubule binding protein Mud. Together, this complex recruits dynein on astral microtubule, providing the necessary force to position the mitotic spindle along the apicobasal axis (Bowman et al., 2006; Du and Macara, 2004; Du et al., 2001; Izumi et al., 2006; Schaefer et al., 2000; Siller et al., 2006). The homologs of Pins (AGS3 and LGN, also known as GPSM1 and GPSM2, respectively), G α i (GNAI1-GNAI3) and Mud (NUMA1), have also been involved in the control of mitotic spindle orientation in various tissues in vertebrates (Lu and Johnston, 2013; Morin and Bellaïche, 2011).

In the developing central nervous system, the importance of division orientation in the production of asymmetric cell divisions remains a matter of debate (Lancaster and Knoblich, 2012). Although some studies in the developing neocortex and neural tube provided evidence that apicobasal divisions trigger asymmetric proliferative divisions producing a progenitor cell and a neuron (Alexandre et al., 2010; Das and Storey, 2012; Xie et al., 2013), others have suggested that apicobasal divisions do not play a part in cell fate decisions, but instead control the position of progenitors in the neuroepithelium (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007), which was later proposed to control the balance between direct and indirect neurogenesis in the developing neocortex (Postiglione et al., 2011). In these studies, divisions generating two neurons ('terminal' divisions) were generally considered symmetric, even though they are *de facto* asymmetric when the neuronal cells produced are of different types.

In the developing rat retina, retinal progenitor cells (RPCs) divide almost exclusively with their mitotic spindle parallel to the plane of the neuroepithelium (horizontal) at early stages when divisions are mostly proliferative (Cayouette et al., 2001), arguing against a role for division orientation in asymmetric proliferative divisions. At late stages of retinogenesis, however, when many divisions are terminal, some RPCs reorient their spindle to divide at perpendicular angles (vertical) relative to the neuroepithelium (Cayouette et al., 2001). Live imaging experiments have shown that such vertical divisions are terminal and largely correlate with the production of two differentiating daughter cells that acquire different fates, whereas terminal divisions with a horizontal spindle correlate with the production of two differentiating daughter cells that acquire the same fate (Cayouette and Raff, 2003). It remains unclear, however, whether division orientation simply correlates with, or actually determines asymmetric outcome in RPC terminal divisions. Here,

¹Cellular Neurobiology Research Unit, Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), Montréal, Québec, Canada H2W 1R7. ²Integrated Program in Neuroscience, McGill University, Montréal, Québec, Canada H3A 2B4.

³Department of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4. ⁴Department of Anatomy and Cell Biology, and Division of Experimental Medicine, McGill University, Montréal, Québec, Canada H3A 0G4.

*Present address: The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME 04609, USA.

[†]Author for correspondence (michel.cayouette@ircm.qc.ca)

Received 12 August 2015; Accepted 5 January 2016

DEVELOPMENT

we address this question by altering spindle orientation using genetic inactivation of LGN in RPCs.

RESULTS AND DISCUSSION

Localization of LGN varies depending on division orientation in RPCs

Because LGN is a key member of the spindle orientation complex, we hypothesized that it might be involved in regulating the orientation of RPC division. Consistently, we found abundant expression of *Lgn* and *Ags3* in the progenitor layer (Fig. 1A-F). We next studied LGN protein localization in RPCs at P0. In interphase RPCs, LGN was detected around the plasma membrane, but was enriched at the apical domain (Fig. 1G). In mitosis, LGN labeling was mostly concentrated at the lateral poles and excluded from the apical domain in horizontal divisions (Fig. 1I,I',K), whereas it invaded the apical domain in oblique and vertical divisions (Fig. 1J-K). Because LGN antibodies also recognize the LGN

homolog AGS3 (Konno et al., 2008 and Fig. S1), we wanted to provide additional evidence for the localization of LGN itself in RPCs. To do this, we electroporated a construct coding for an EGFP::LGN fusion protein in P0 retinas *in vivo* and studied its localization 24 h later. Consistent with immunostaining results, EGFP::LGN was enriched at the apical domain in interphase RPCs (Fig. 1L,M), and localized to the lateral poles but not the apical domain in horizontal mitotic RPCs, whereas it was found apically in vertical mitotic RPCs (Fig. 1N-P). These results suggest that LGN might be required at the apical domain to instruct vertical divisions.

LGN is required for vertical spindle orientation in mouse RPCs

To study LGN function in spindle orientation, we analyzed P0 retinas of a LGN knockout mouse (*Lgn*^{-/-}) that we previously generated (Tarchini et al., 2013) and used heterozygote littermates

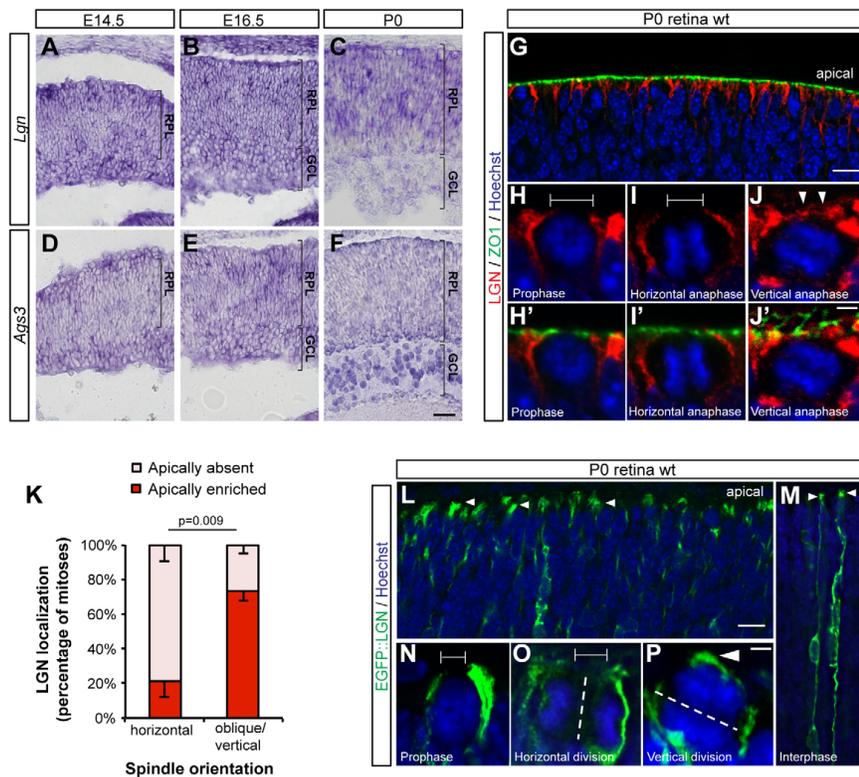


Fig. 1. LGN is expressed in the retina. (A-F) *In situ* hybridization on transverse retinal sections with *Lgn* (A-C) and *Ags3* (D-F) antisense probes. E, embryonic day; P, postnatal day; RPL, retinal progenitor cell layer; GCL, ganglion cell layer. (G-J) Immunofluorescence staining for LGN (red) and the apical junction marker ZO-1 (green) in wild-type mouse retina at P0. In prophase (H,H') and horizontal anaphase/telophase cells (I,I'), LGN is localized to the basolateral membrane and absent from the apical membrane (brackets), as defined by the space between the ZO-1-labeled junctions. In vertical and oblique anaphase RPCs (J,J'), LGN is detected at the apical membrane (arrowheads). In J', the ZO-1 staining observed at the top of the panel arises from the apical membrane of the retinal pigment epithelium, which remains attached to the retina in this example. (K) LGN localization in anaphase/telophase RPCs as a function of spindle orientation. Data presented as means±s.e.m. (n=47 horizontal divisions and n=35 oblique/vertical divisions from 3 mice). (L-P) EGFP::LGN localization 24 h after electroporation in P0 retinas *in vivo*. In interphase RPCs (L,M), EGFP::LGN is enriched at the apical domain (arrowheads). In mitotic RPCs (N-P), EGFP::LGN localizes to the basolateral membrane in prophase and horizontal anaphase (brackets), but invades the apical domain in vertical anaphase cells (arrowhead). Dashed lines in O and P indicate cleavage planes. Scale bars: 50 μ m in A-F, 10 μ m in G,L and 2 μ m in H-J and N-P. In all images, apical side faces up.

(*Lgn*^{+/-}) as controls. We measured the angle of the mitotic spindle by tracing a line between the two centrosomes in 3D, relative to the plane of the apical surface (see Materials and Methods and Fig. 2A,B).

In controls, we found that most divisions were horizontal ($\leq 30^\circ$), whereas 33% were either oblique (30-60°) or vertical ($>60^\circ$) (Fig. 2C). These numbers are similar to those obtained in wild-type retinas (Cayouette and Raff, 2003; Cayouette et al., 2001), suggesting that the loss of one copy of LGN in heterozygotes does not significantly alter spindle orientation. In *Lgn*^{-/-} mice, however, the proportions of oblique and vertical divisions were reduced by more than half (Fig. 2C). Thus, much like in *Drosophila* neuroblasts and mouse skin epithelial cells (Schaefer et al., 2000; Williams et al., 2014; Yu et al., 2000), LGN is required to promote vertical spindle orientation in mouse RPCs. These results also indicate that LGN is not absolutely required for horizontal divisions, suggesting that the absence of LGN at the apical membrane in horizontal divisions is functionally more important than its presence at the lateral poles in RPCs. Because AGS3 is expressed in RPCs, and was shown to control spindle orientation in cortical progenitors (Sanada and Tsai, 2005), it is possible that AGS3 compensates for LGN inactivation. It will be interesting in the future to generate double-knockout animals to investigate this possibility. Additionally, identifying the mechanisms operating to exclude LGN from the apical domain will be important to understand how horizontal divisions are generated in RPCs.

Inactivation of LGN decreases apical progenitors in the developing neocortex but not the retina

Our results point to a role for LGN in promoting vertical divisions in the retina, which is in sharp contrast to previously published data in the mouse neocortex and chick neural tube, where LGN is required to maintain horizontal divisions (Konno et al., 2008; Morin et al., 2007). We therefore wondered whether this discrepancy could be due to tissue-specific functions of LGN or could be explained by differences in the mouse mutants used (Konno et al., 2008; Tarchini et al., 2013). As previously reported (Konno et al., 2008), we found

that spindle orientation of cortical progenitors was randomized in our *Lgn*^{-/-} mouse model at embryonic day (E)14.5 (Fig. 2D). Thus, in the same mouse model, LGN inactivation decreases or increases vertical divisions in retinal and cortical progenitors, respectively, suggesting tissue-specific functions.

We next wondered whether the alterations in spindle orientation observed in the developing neocortex and retina could affect the number and distribution of proliferating cells. As previously reported (Konno et al., 2008), we observed an important increase in BrdU-positive and pH3-positive cells outside the ventricular zone of *Lgn*^{-/-} cortices at the expense of apical progenitors (Fig. 3A-F), confirming a role for LGN in maintaining planar divisions and self-renewal of cortical progenitors. When we analyzed proliferation in the mouse retina, however, we did not observe significant changes in the number or location of BrdU-positive and pH3-positive cells in *Lgn*^{-/-} compared with controls at both E14.5 and P0 (Fig. 3G-M and Fig. S2). Thus, inactivation of LGN does not affect proliferative divisions in the mouse retina, suggesting that they are regulated independently of division orientation.

LGN is required for terminal asymmetric cell divisions in the mouse retina

Because altering division orientation did not affect proliferation in the retina, we hypothesized that it could be involved in the production of symmetric or asymmetric terminal divisions. To directly address this question, we used a GFP retroviral vector to clonally mark RPC lineages in retinal explants prepared from *Lgn*^{+/-} or *Lgn*^{-/-} mice at postnatal day (P)0. Fourteen days later, when all the cells had differentiated, we studied the cellular composition of the resulting clones using morphology, layer position, and cell type specific marker expression (Fig. 4A). When we analyzed the overall size distribution of the clones produced in *Lgn*^{-/-} retinas compared with their control littermates, we found no difference (Fig. 4B), further supporting our conclusion that changing spindle orientation does not affect proliferation or cell death in the retina.

To more directly study the outcome of terminal divisions, we focused our analysis on two-cell clones. Since naturally occurring cell

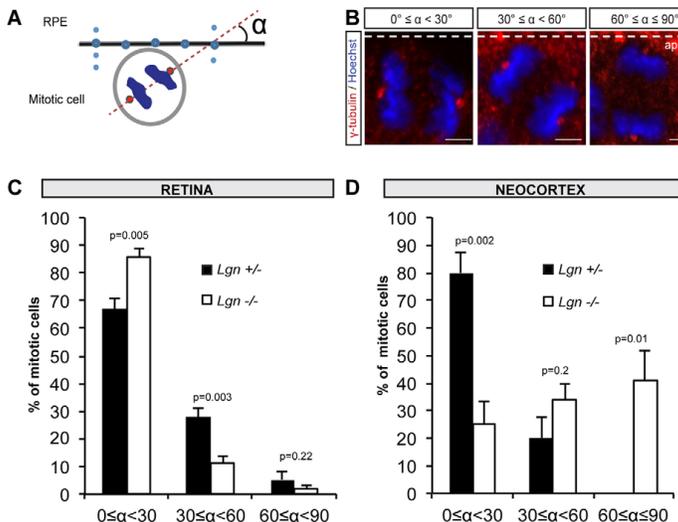


Fig. 2. LGN inactivation decreases vertical divisions in the retina but randomizes division orientation in the neocortex. (A) Cartoon illustrating the method used to calculate mitotic spindle orientations. Centrosomes are shown in red and DNA in blue. The plane of the apical surface is obtained by defining several coordinates (blue dots) in 3D along the interface between the retinal pigment epithelium (RPE) and the neural retina. The angle (α) of the mitotic spindle is then calculated using standard trigonometry. (B) Examples of horizontal (0-30°), oblique (30-60°) and vertical divisions (60-90°). Sections were stained for γ -tubulin (red) and Hoechst (blue). Scale bars: 1 μ m. (C) Quantification of mitotic spindle orientation in P0 RPCs in 4 *Lgn*^{+/-} ($n=256$ cells analyzed) and 6 *Lgn*^{-/-} ($n=358$ cells analyzed). (D) Quantification of mitotic spindle orientation in E14.5 forebrain progenitors from 3 *Lgn*^{+/-} mice ($n=69$ cells analyzed) and 4 *Lgn*^{-/-} mice ($n=102$ cells analyzed). In C and D, data are presented as means \pm s.e.m., two-tailed *t*-test.

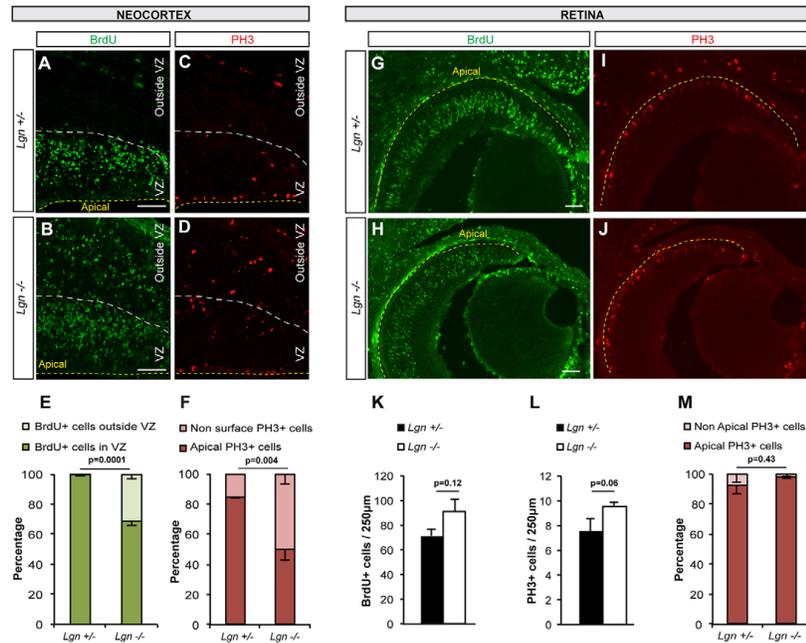


Fig. 3. LGN inactivation increases non-surface progenitors in the developing neocortex but not the retina. (A-D) Immunostaining for BrdU (A,B) and pH3 (C,D) in frontal sections of E14.5 forebrain from *Lgn*^{+/-} (A,C) and *Lgn*^{-/-} (B,D) mice. VZ, ventricular zone. The yellow dashed line indicates the apical surface and the white dashed line marks the basal side of the VZ. Scale bar: 50 µm. (E,F) Quantification of BrdU⁺ and pH3⁺ cells in control ($n=4$) and *Lgn*^{-/-} forebrain ($n=4$) at E14.5 (data obtained from 3 independent experiments, presented as means±s.e.m., two-tailed *t*-test). (G-J) Immunostaining for BrdU and pH3 on E14.5 retinal sections from *Lgn*^{+/-} and *Lgn*^{-/-} mice, as indicated. The yellow dashed line indicates the apical surface. Scale bar: 50 µm. (K-M) Quantification of BrdU⁺ and pH3⁺ cells in *Lgn*^{+/-} ($n=4$) and *Lgn*^{-/-} ($n=4$) mice at E14.5 (data obtained from 4 independent experiments, presented as means±s.e.m., two-tailed *t*-test).

death is limited in the developing retina (Young, 1984), we assume that these divisions are generated by RPCs undergoing a terminal division producing two differentiating daughter cells. Remarkably, we found that terminal asymmetric divisions were reduced by more than half in absence of LGN (*Lgn*^{+/-}, 23.5%; *Lgn*^{-/-}, 10%), whereas terminal symmetric divisions were increased accordingly (*Lgn*^{+/-}, 76.5%; *Lgn*^{-/-}, 90%). More specifically, terminal asymmetric divisions giving rise to a photoreceptor and a bipolar or an amacrine cell were reduced in *Lgn*^{-/-}, whereas terminal symmetric divisions giving rise to two photoreceptors were increased (Fig. 4C). Interestingly, the proportions of symmetric and asymmetric terminal divisions observed in *Lgn*^{-/-} retinas and controls are consistent with the respective proportions of horizontal and vertical divisions observed in each genotype (compare Fig. 2C and Fig. 4C). We therefore conclude that, in the mouse retina, vertical spindle orientation is required for the production of terminal asymmetric divisions. In a previous study, we showed that the endocytic adaptor protein NUMB localizes apically in RPCs and is essential for the production of terminal asymmetric cell divisions (Kechad et al., 2012). Because we did not detect any change in NUMB localization in the *Lgn*^{-/-} retina (Fig. S3), we propose that the increased number of horizontal divisions observed in *Lgn*^{-/-} retinas promotes symmetric inheritance of NUMB, which increases symmetric terminal divisions at the expense of asymmetric terminal divisions.

As we find that reorientation of the mitotic spindle is only involved in the production of terminal asymmetric divisions, we predicted that

this would not have much effect on the overall proportions of each cell type in the mature retina. Indeed, when we used the data from retinal lineages that we reconstructed in a previous study (Gomes et al., 2011) and changed the composition of asymmetric terminal divisions to a symmetric pair of photoreceptors in 13% of the cases, which represent the changes observed in *Lgn*^{-/-} retinas (see Fig. 4C), we found that this would result in only a small percentage difference in overall cell type composition (Fig. S4A). Consistent with this modelization, we did not detect significant changes in overall cell type proportions in the *Lgn*^{-/-} retinas compared with controls (Fig. S4B-K). Although re-orientation of the mitotic spindle in terminal divisions might not drastically affect the overall distribution of cell types, it might allow the formation of functional circuits between sister cells, which were shown to preferentially make synaptic contact with each other in the neocortex (Yu et al., 2009).

We next wondered whether *Gai*, a well-known partner of LGN, was involved in controlling spindle orientation in RPCs. We found that at least two of the three *Gai* mouse genes (*Gnai2* and *Gnai3*), as well as *Gao* (*Gnao1*), are expressed in the retina at P0 (Fig. 4D,E). To inactivate G protein signaling, we used a retroviral construct encoding the catalytic subunit of pertussis toxin (PTXa) and GFP from an internal ribosome entry site (Peyre et al., 2011). In a previous study, we established that PTXa impairs the co-immunoprecipitation of LGN with *Gai* and delocalizes LGN from the cell cortex (Tarchini et al., 2013). Similarly, we found that PTXa delocalized LGN from RPC membranes (Fig. S4L). If LGN requires interaction with *Gai* to

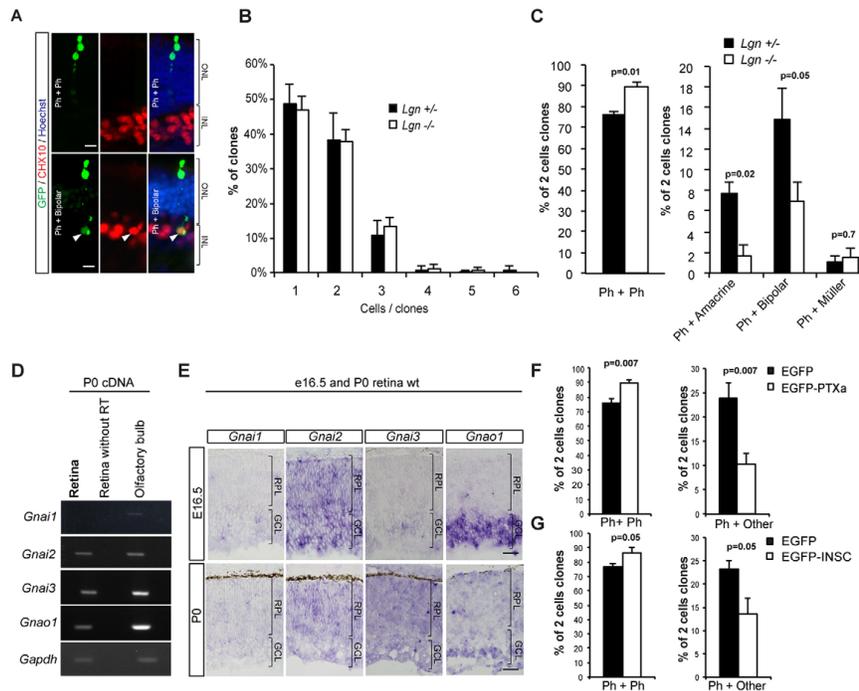


Fig. 4. LGN and *Gai* activity are required for terminal asymmetric cell divisions in the retina. (A) Examples of two-cell clones obtained 14 days after infection of *Lgn*^{+/-} or *Lgn*^{-/-} retinal explants at P0 with a GFP retroviral vector. Retinal sections are stained with CHX10 to identify bipolar cells (arrowhead). Ph, photoreceptor; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bar: 5 μ m. (B) Average number of cells per clones in 4 *Lgn*^{+/-} ($n=450$ clones) and 5 *Lgn*^{-/-} ($n=599$ clones) mice from 4 independent experiments (means \pm s.e.m.). The clone size distribution is not significantly different between conditions. (C) Composition of two-cell clones in 4 *Lgn*^{+/-} ($n=172$ two-cell clones) and 5 *Lgn*^{-/-} ($n=219$ two-cell clones) mice from 4 independent experiments (means \pm s.e.m., two-tailed *t*-test). (D) RT-PCR at P0 for *Gnai1-Gnai3* and *Gnao1*. RT, reverse transcription. (E) *In situ* hybridization for *Gnai1-Gnai3* and *Gnao1* on retinal sections. Scale bars: 50 μ m for P0 and 150 μ m for E16.5. RPL, retinal progenitor cell layer; GCL, ganglion cell layer. (F, G) Composition of two-cell clones 14 days after infection with retroviral vectors expressing a control EGFP compared with EGFP-PTXa (F) or EGFP-INSC (G). Data presented as means \pm s.e.m.; two-tailed *t*-test. In F, $n=341$ two-cell clones for EGFP and $n=248$ two-cell clones for EGFP-PTXa, from 5 independent experiments. In G, $n=274$ two-cell clones for EGFP and $n=259$ two-cell clones for EGFP-INSC, from 4 independent experiments.

reorient the mitotic spindle, we predicted that PTXa would phenocopy LGN inactivation. Consistently, we found that terminal symmetric divisions were increased, whereas terminal asymmetric divisions were reduced upon inactivation of *Gai* (Fig. 4F), suggesting that LGN functions together with *Gai* to promote vertical divisions in RPCs. Similarly, overexpression of mouse *inscuteable* (INSC), another key regulator of division orientation, phenocopied *Gai* and LGN inactivation (Fig. 4G). Thus, much like in the neocortex, INSC overexpression produces a similar phenotype to LGN inactivation (Konno et al., 2008; Postiglione et al., 2011), although in the retina their effect on division orientation is apparently opposite, suggesting that different mechanisms are at play.

In conclusion, this study demonstrates a key role for mitotic spindle orientation in the production of symmetric and asymmetric terminal divisions in the mouse retina, and establishes LGN and *Gai* as key regulators in this context. Importantly, we report that inactivation of LGN disrupts spindle orientation in both the developing neocortex and retina, but this leads to very different outcomes. What exactly triggers different fate decisions after reorientation of the mitotic spindle in the neocortex and retina remains unclear, but it is likely to involve segregation of different

fate determinants and a tight control over the timing of spindle reorientation. It will be interesting in the future to determine why the spindle appears to reorient only at terminal divisions in the retina, whereas it reorients in proliferative divisions in the developing neocortex. This is likely to involve novel regulators of LGN activity or localization that are tissue dependent and temporally restricted.

MATERIALS AND METHODS

Animals

All animal work was performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines. CD1 and LGN mutants of either sex were used in this study.

Cell lines

COS-7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen) and penicillin-streptomycin (Invitrogen) in a 37°C humidified incubator with 5% carbon dioxide.

Mitotic spindle orientation

Mitotic spindle orientation was measured as previously described (Cayouette et al., 2001), with the exception that a 3D plane, instead of a

line, was used as the reference, as reported (Juschke et al., 2014). Further details can be found in the supplementary Materials and Methods.

Retinal explant culture

P0 retinal explants were prepared and infected with retroviruses as previously described (Cayouette et al., 2001). The explants were infected with a retroviral vector encoding green fluorescent protein (LZRS, pBird, pBird-PTXa or pBird-INSC). Retroviral vectors were prepared in Phoenix packaging cell line and used to infect explants as described previously (Cayouette and Raff, 2003).

Clonal analysis

After 14 days in culture, the explants were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 30 min at room temperature and processed for immunostaining. Clones derived by each infected retinal progenitor cells were analyzed by counting the number of each cell type present in radial clusters, using morphology, position in the cell layers and expression of CHX10 or PAX6 as a marker of bipolar cells and amacrine cells, according to standard procedures as previously described (Elliott et al., 2008; Kechad et al., 2012).

In situ hybridization

Digoxigenin-labeled RNA probes were synthesized from pSport6-LGN, pGEMTeasy-AGS3, pGEMteasy-Gox, pGEMteasy-Goi1, pGEMteasy-Goi2 and pGEMteasy-Goi3. Eyes and head were fixed in 4% PFA overnight, frozen in OCT and sectioned at 12 μ m. Sections were incubated with hybridization buffer at 65°C and with 100 ng/ml RNA probe in hybridization buffer (50% formamide, 5 \times saline-sodium citrate, 5 \times Denhardt's, 5 mg/ml Torula RNA). The probes were detected with an alkaline phosphatase-conjugated anti-digoxigenin antibody (1:2500, Roche). The AP activity was revealed using 4-nitro blue tetrazolium chloride (NBT/BCIP; Roche).

Histology and immunofluorescence

Eyes were enucleated in PBS and fixed by immersion in freshly prepared 4% PFA in PBS, or in 10% trichloroacetic acid (TCA) diluted in water for LGN staining. Eyes were cryoprotected overnight at 4°C in sucrose 20%, embedded in 20% sucrose:OCT (1:1), and stored at -80°C until sectioning. Mouse brains were fixed in 4% PFA in phosphate buffer at 4°C following by cryoprotection in 20% sucrose and embedded in OCT. Eyes and brains were cryosectioned at 12 μ m and retinal explants at 25 μ m, and processed for staining on the same day. Slides were pre-incubated for 1 h in blocking buffer (1% BSA) and incubated overnight at 4°C with primary antibody (see supplementary Materials and Methods for details) diluted in blocking buffer. *In vivo* BrdU incorporation was done by intraperitoneal injection of BrdU (100 mg BrdU/kg) for 1 h. For detection of BrdU, sections were treated with 2 N HCl at 37°C for 30 min before incubation with primary antibodies. Primary antibodies were detected using appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 488, 555 or 594 (1:1000; Invitrogen) diluted in PBS at room temperature for 1 h. In all cases, nuclei were stained with Hoechst 33342 (1:20,000, Molecular Probes). The slides were mounted in Mowiol.

Retinal electroporation

DNA preparations were diluted in water containing 0.5% Fast Green and injected subretinally at P0 in pups. After the injection, tweezer-type electrodes (Gene paddles, 3 x 5 mm Paddles Model 542, Harvard Apparatus), soaked in PBS were placed on either side of the head over the eyes and five square pulses of 50 ms at 80 V were applied using a pulse generator (ECM 830 Square Wave Electroporation System, Harvard Apparatus). Pups were sacrificed after 24 h, the eyes were removed, fixed and processed for immunostaining as described above.

Quantitative analysis

The number of cells expressing the different cell type-specific markers was quantified by averaging the number of positive cells from three regions of 250 μ m in the retina and brain. Statistical comparisons were done using two-tailed Student's *t*-test.

Acknowledgements

We thank Christine Jolicoeur, Qinzhang Zhu and Jessica Barthe for technical assistance, and Dominic Fillion for help with microscopy and MATLAB. We thank F. Matsuzaki and Q. Du for LGN antibodies, X. Morin for the PTXa construct and J. Blumer for the AGS3 construct.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: M.L. and M.C.; experimentation and data analysis: M.L., B.T., C.B.-P. and C.M.; manuscript writing: M.L. and M.C.; manuscript editing: B.T. and C.M.; supervision and funding: M.C.

Funding

This work was supported by research grants from the Foundation for Fighting Blindness Canada, the Canadian Institutes of Health Research and the Brain Canada/W. Garfield Weston Foundations to M.C. M.L. was supported by an IRCM-Fondation Jean Coutu Postdoctoral Fellowship, and M.C. is a Senior Fellow of the Fond de la recherche en santé Québec – Santé/Fondation Antoine Turmel.

Supplementary information

Supplementary information available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.129783/-/DC1>

References

- Alexandre, P., Reugels, A. M., Barker, D., Blanc, E. and Clarke, J. D. W. (2010). Neurons derive from the more apical daughter in asymmetric divisions in the zebrafish neural tube. *Nat. Neurosci.* **13**, 673-679.
- Bowman, S. K., Neumüller, R. A., Novatchkova, M., Du, Q. and Knoblich, J. A. (2006). The *Drosophila* NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division. *Dev. Cell* **10**, 731-742.
- Cayouette, M. and Raff, M. (2003). The orientation of cell division influences cell-fate choice in the developing mammalian retina. *Development* **130**, 2329-2339.
- 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.
- Das, R. M. and Storey, K. G. (2012). Mitotic spindle orientation can direct cell fate and bias Notch activity in chick neural tube. *EMBO Rep.* **13**, 448-454.
- Du, Q. and Macara, I. G. (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell* **119**, 503-516.
- Du, Q., Stukenberg, P. T. and Macara, I. G. (2001). A mammalian Partner of inscuteable binds NuMA and regulates mitotic spindle organization. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1069-1075.
- Elliott, J., Jolicoeur, C., Ramamurthy, V. and Cayouette, M. (2008). Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells. *Neuron* **60**, 26-39.
- Gomes, F. L. A. F., Zhang, G., Carbonell, F., Correa, J. A., Harris, W. A., Simons, B. D. and Cayouette, M. (2011). Reconstruction of rat retinal progenitor cell lineages in vitro reveals a surprising degree of stochasticity in cell fate decisions. *Development* **138**, 227-235.
- Gönczy, P. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 355-366.
- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T. and Matsuzaki, F. (2006). *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat. Cell Biol.* **8**, 586-593.
- Juschke, C., Xie, Y., Postiglione, M. P. and Knoblich, J. A. (2014). Analysis and modeling of mitotic spindle orientations in three dimensions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 1014-1019.
- Kechad, A., Jolicoeur, C., Tufford, A., Mattar, P., Chow, R. W. Y., Harris, W. A. and Cayouette, M. (2012). Numb is required for the production of terminal asymmetric cell divisions in the developing mouse retina. *J. Neurosci.* **32**, 17197-17210.
- Knoblich, J. A. (2008). Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**, 583-597.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T. and Matsuzaki, F. (2008). Neuroepithelial progenitors undergo LGN-dependent planar divisions to maintain self-renewability during mammalian neurogenesis. *Nat. Cell Biol.* **10**, 93-101.
- Lancaster, M. A. and Knoblich, J. A. (2012). Spindle orientation in mammalian cerebral cortical development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 737-746.
- Lu, M. S. and Johnston, C. A. (2013). Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development* **140**, 1843-1856.
- Morin, X. and Bellaïche, Y. (2011). Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev. Cell* **21**, 102-119.

- Morin, X., Jaouen, F. and Durbec, P.** (2007). Control of planar divisions by the G-protein regulator LGN maintains progenitors in the chick neuroepithelium. *Nat. Neurosci.* **10**, 1440-1448.
- Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P. and Morin, X.** (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *J. Cell Biol.* **193**, 141-154.
- Postiglione, M. P., Jüschke, C., Xie, Y., Haas, G. A., Charalambous, C. and Knoblich, J. A.** (2011). Mouse inscuteable induces apical-Basal spindle orientation to facilitate intermediate progenitor generation in the developing neocortex. *Neuron* **72**, 269-284.
- Sanada, K. and Tsai, L.-H.** (2005). G protein betagamma subunits and AGS3 control spindle orientation and asymmetric cell fate of cerebral cortical progenitors. *Cell* **122**, 119-131.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Knoblich, J. A.** (2000). A protein complex containing Inscuteable and the Galpha-binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in Drosophila. *Curr. Biol.* **10**, 353-362.
- Siller, K. H. and Doe, C. Q.** (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* **11**, 365-374.
- Siller, K. H., Cabernard, C. and Doe, C. Q.** (2006). The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in Drosophila neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* **8**, 594-600.
- Tarchini, B., Jolicoeur, C. and Cayouette, M.** (2013). A molecular blueprint at the apical surface establishes planar asymmetry in cochlear hair cells. *Dev. Cell* **27**, 88-102.
- Williams, S. E., Ratliff, L. A., Postiglione, M. P., Knoblich, J. A. and Fuchs, E.** (2014). Par3-mInsc and Galpha3 cooperate to promote oriented epidermal cell divisions through LGN. *Nat. Cell Biol.* **16**, 758-769.
- Xie, Y., Jüschke, C., Esk, C., Hirotsune, S. and Knoblich, J. A.** (2013). The phosphatase PP4c controls spindle orientation to maintain proliferative symmetric divisions in the developing neocortex. *Neuron* **79**, 254-265.
- Young, R. W.** (1984). Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. Comp. Neurol.* **229**, 362-373.
- Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X. and Chia, W.** (2000). Analysis of partner of inscuteable, a novel player of Drosophila asymmetric divisions, reveals two distinct steps in inscuteable apical localization. *Cell* **100**, 399-409.
- Yu, F., Kuo, C. T. and Jan, Y. N.** (2006). Drosophila neuroblast asymmetric cell division: recent advances and implications for stem cell biology. *Neuron* **51**, 13-20.
- Yu, Y. C., Bultje, R. S., Wang, X. and Shi, S. H.** (2009). Specific synapses develop preferentially among sister excitatory neurons in the neocortex. *Nature* **458**, 501-504.

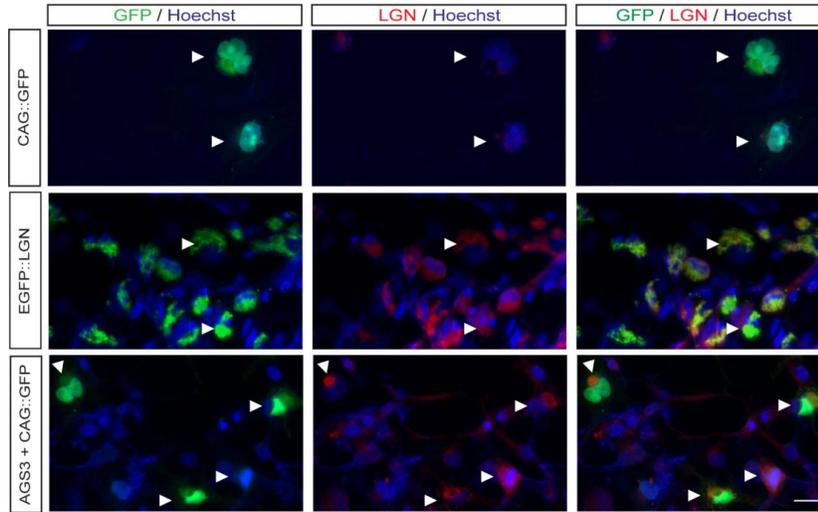


Fig. S1. LGN antibody characterization. Immunostaining for LGN on COS cells transfected with plasmids expressing GFP alone (CAG-GFP), EGFP::LGN, or AGS3 and GFP. Cultured cells were fixed 48hr after transfection and stained with the anti-LGN antibody (Sigma, red). While 100% of the cells transfected with EGFP::LGN are stained with the LGN antibody, as expected, 73% of the cells transfected with AGS3 are also stained with the anti-LGN antibody (arrowheads), showing cross-reactivity. Scale bar: 20 μ m.

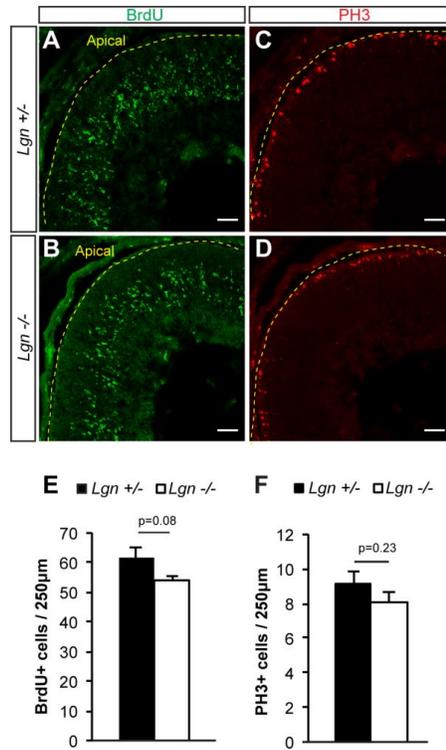


Fig. S2. LGN inactivation does not affect proliferation in the retina at P0. Immunostaining for BrdU (A, B) and pH3 (C, D) on retinal sections at P0 in *Lgn*^{+/-} (A,C) and *Lgn*^{-/-} (B,D). Scale bar : 20 μm. (E, F) Quantification of total BrdU+ (E) and pH3+ (F) cells in 4 *Lgn*^{+/-} and 4 *Lgn*^{-/-} retinas at P0 from 2 experiments. Data presented as mean ± s.e.m.; two-tailed *t*-test. Yellow dashed line identifies the apical side.

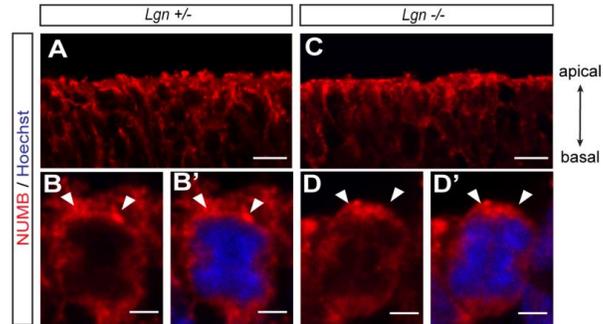


Fig. S3. NUMB localization is not affected in LGN $-/-$ retinas. Confocal images of mitotic cells in the mouse retina at P0 in *Lgn +/-* and *Lgn -/-*. Sections were stained for NUMB and Hoechst to visualize DNA. NUMB staining is concentrated apically (arrowheads) in both conditions. Scale bar: 10 μ m and 1 μ m. 4 *Lgn +/-* and 5 *Lgn -/-* were analyzed.

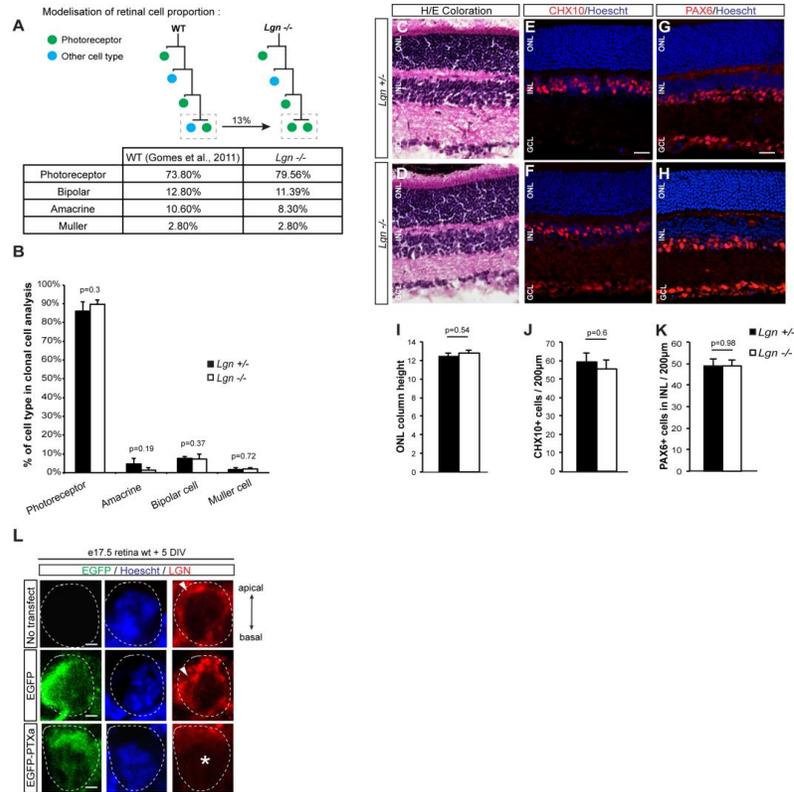


Fig. S4. LGN inactivation does not significantly affect overall retinal cell type proportions in the adult retina and PTXa delocalizes LGN from the cell cortex. (A) Predicted retinal cell proportions in *Lgn*^{-/-} when 13% of terminal divisions are changed from an asymmetric to a symmetric photoreceptor-photoreceptor daughter cell pair (boxed), as observed in the lineage study presented in Figure 4C. Raw lineage data from Gomes et al. 2011 was used as a reference for wildtype values. **(B)** Percentage of cell type in clonal analysis shown in Figure 4B-D. **(C, D)** Hematoxylin/Eosin (H/E) coloration on *Lgn*^{+/-} and *Lgn*^{-/-} retinal sections at P14. **(E-H)** Immunostaining for CHX10, a bipolar cell marker, and PAX6, an amacrine cell marker, on retinal sections at P14 in *Lgn*^{+/-} and *Lgn*^{-/-}, as indicated. GCL: ganglion cell layer, INL: inner nuclear layer, ONL: outer nuclear layer. Scale bar: 20 μm. **(I-K)** Quantification of photoreceptor nuclei column height (I), CHX10-positive (J) and PAX6-positive (K) cells in the inner nuclear layer in 4 *Lgn*^{+/-} and 4 *Lgn*^{-/-} retinas from 4 independent experiments, mean ± s.e.m., two-tailed *t*-test. **(L)** Immunostaining for LGN on retinal explants 5 days after electroporation at E17.5 with EGFP or EGFP-PTXa. LGN labelling at the membrane (arrowhead) is severely reduced in cells expressing EGFP-PTXa compared to EGFP or untransfected controls (asterisk). Scale bar: 1 μm.

Supplementary Material and Methods

Mitotic Spindle Orientation

Centrosomes were stained with anti- γ -tubulin antibody and DNA labeled with Hoechst. The orientation of the spindle axis was measured from the x, y, and z coordinates of the centrosome pairs relative to the plane of the neuroepithelium corresponding to the interface between the RPE and the neural retina using a MATLAB program (The Mathworks Inc., Natick, MA). We analysed the centrosome pairs in cells in either metaphase or anaphase-telophase. Statistical comparisons were done using Student's t test.

Histology, Immunofluorescence and Image acquisition

Primary antibodies used were: rabbit anti-LGN (GPSM2) (1:200 Sigma cat# HPA007327 lot# A41537) and from F. Matsuzaki (Konno et al., 2008), rat anti-ZO-1 (1:200 DSHB cat# R26.4C), rabbit anti-GFP (1:1000 Life Technology cat# A11122, lot#1691382), mouse anti-BrdU (1:400 Dako cat# M074401-8, clone BU20A, lot# 20006290), rabbit anti-phospho-histone 3 (1:400 Millipore cat # 06-570, lot# 2370127), goat anti- γ -tubuline (1:400 Santa Cruz Biotechnology cat# SC-7396, lot# J3013), sheep anti-Chx10 (1:400 Exalpha cat# X1180P, lot# 12969), rabbit anti-Pax6 (1:400 Chemicon Millipore AB2237, lot# 2455611), sheep anti-GFP (1:400 Serotec cat# 4745-1051, lot# 0607), rabbit anti-Numb (1:200 Abcam cat# AB14140, lot# GR160743-1).

Annexe 4, preview de l'article (Chiu *et al.* 2016) : (Li et Wang 2016)

Developmental Cell
Previews

CellPress

Tug of War in Spindle Orientation

Song Li¹ and Hongyan Wang^{1,2,3,*}

¹Neuroscience & Behavioral Disorders Program, Duke-NUS Medical School, 8 College Road, Singapore 169857, Singapore

²Department of Physiology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 117597, Singapore

³NUS Graduate School for Integrative Sciences and Engineering, National University of Singapore, 28 Medical Drive, Singapore 117456, Singapore

*Correspondence: hongyan.wang@duke-nus.edu.sg

<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.026>

The evolutionarily conserved G α i-LGN-NuMA protein complex is a key regulator of spindle orientation, but how its spatiotemporal localization is achieved remains elusive. Chiu *et al.* (2016) show that SAPCD2 negatively regulates LGN cortical localization by competing with NuMA for LGN binding in both epithelial cells and mouse retinal progenitor cells.

Oriented cell division is essential for the development of stem cell lineages and for tissue homeostasis. During asymmetric cell division, correct division orientation depends on proper spindle orientation. In the developing vertebrate retina, while the majority of retinal progenitor cells (RPCs) divide horizontally within the plane of the neuroepithelium, a small fraction of RPCs at late stages of retinogenesis reorient their mitotic spindle to divide vertically at perpendicular angles (Cayouette *et al.*, 2001). The highly conserved ternary complex G α i-LGN-NuMA and the minus-end-directed Dynein that regulate spindle orientation in various organisms and developmental contexts also control vertical division of RPCs (Gotta *et al.*, 2003; Konno *et al.*, 2008; Kotak *et al.*, 2012; Schaefer *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2000). G α i-GDP, tethered at the plasma membrane, interacts with the C-terminal GoLoco motifs of LGN to recruit LGN to the cell cortex. During mitosis, LGN interacts through its N-terminal Tetratricopeptide repeats (TPRs) with the microtubule-binding protein NuMA (Du and Macara, 2004). The simultaneous binding of G α i and NuMA to LGN results in a conformational switch of LGN, from a “closed” state to an “open” state, by disrupting the intramolecular association of N and C termini of LGN (Du and Macara, 2004). This ternary complex anchors Dynein at the plasma membrane to ensure proper spindle positioning (Kotak *et al.*, 2012). However, the delicate spatiotemporal regulation of G α i-LGN-NuMA localization is poorly understood. Specifically, it was unclear how the exclusion of the ternary complex from the apical domain occurs in RPCs.

In this issue of *Developmental Cell*, Chiu *et al.* (2016) now show that Suppressor APC domain containing 2 (SAPCD2) is a binding partner of LGN and a negative regulator of G α i-LGN-NuMA localization, both in RPCs *in vivo* and epithelial cells *in vitro*. To identify new regulators of the G α i-LGN-NuMA ternary complex, Chiu *et al.* performed protein purification and mass spectrometry using a FLAG-tagged GTPase-deficient G α i-Q204L and uncovered SAPCD2 as a potential G α i interactor. Their subsequent analyses demonstrated that this interaction is likely indirect and bridged through direct binding between SAPCD2 and AGS3/LGN. Remarkably, SAPCD2 interacts with the N-terminal TPR motifs of LGN, a region that is known to bind to NuMA. This raised the interesting possibility that SAPCD2 and NuMA may compete for the binding to LGN. Indeed, the authors convincingly demonstrate that NuMA inhibits the association of SAPCD2 and LGN in a dose-dependent manner. However, the reverse-competition assay remains to be carried out to establish that SAPCD2 is capable of inhibiting the association between NuMA and LGN. Next, the authors show that in mouse retina, SAPCD2 is expressed in RPCs and newly differentiated neurons, but not in mature retinal cells. Intriguingly, SAPCD2 predominantly localizes to the apical pole in horizontally dividing RPCs and is excluded from the lateral membrane where LGN and NuMA are observed. In contrast, SAPCD2 is hardly detectable in vertically dividing RPCs, in which LGN is expressed throughout the cell cortex. These observations collectively indicate a complementary expression pattern between

SAPCD2 and LGN in RPCs, supporting the hypothesis that SAPCD2 is able to compete with NuMA for LGN binding.

To ascertain the role of SAPCD2 in spindle orientation, the authors first studied its function in organotypic 3D-cultured MDCK cell system, in which the G α i-LGN-NuMA ternary complex is known to regulate spindle orientation. SAPCD2 is also apically localized in polarized MDCK cell monolayers. Importantly, they demonstrate that knocking down SAPCD2 randomizes mitotic spindle orientations, leading to cystogenesis defects. Remarkably, the authors also show that loss of SAPCD2 leads to a 6-fold increase of vertical divisions in mouse RPCs, strongly supporting a role for SAPCD2 in regulating spindle orientation. Prior studies have established a correlation between spindle orientation and symmetric/asymmetric division output in mouse retina (Cayouette and Raff, 2003). To trace the terminal divisions of RPCs, the authors perform retroviral lineage tracing and identify cell fates in two-cell clones. In control animals, the vast majority of RPCs undergo symmetric terminal divisions to produce two photoreceptor cells. In *Sapcd2*^{-/-} retina clones or clones with short hairpin RNA (shRNA) knockdown of *Sapcd2* in RPCs, significantly increased population of RPCs undergo asymmetric terminal divisions, producing a photoreceptor cell and a bipolar, amacrine, or Müller glial cell. Therefore, Chiu *et al.* (2016) demonstrate a direct causal link between spindle orientation and cell fate determination in RPC terminal divisions.

How does SAPCD2 regulate spindle orientation? Given that SAPCD2 potentially competes with NuMA for LGN



binding, and given the complementary expression pattern between SAPCD2 and LGN in RPCs, the authors hypothesize that SAPCD2 regulates spindle orientation by interfering with LGN localization. To test this model, the authors overexpressed SAPCD2 in HeLa cells and found that this effectively reduces the abundance of LGN cortical localization in these mitotic cells. Conversely, depletion of SAPCD2 dramatically enhances the cortical localization of LGN. Moreover, the enhancement of LGN cortical localization by *Gxi* overexpression was suppressed by SAPCD2 overexpression. Remarkably, in *Sapcd2*^{-/-} mutant retina, apical localization of LGN in RPCs increased almost 3-fold compared to the control. All of these observations indicate that SAPCD2 regulates spindle orientation by interfering with the cortical localization of LGN. Future work is needed to test whether SAPCD2 function ultimately influences Dynein localization in RPCs.

What anchors SAPCD2 at the apical cortex in horizontally dividing RPCs is still unclear. Tight junction protein PATJ,

which may also interact with SAPCD2 (Chiu et al., 2016), may tether SAPCD2 to the cell cortex. It remains to be tested whether PAR3, identified in the same SAPCD2 immunoprecipitation experiment, provides the asymmetric cue for SAPCD2 in RPCs. In addition, it will be of great interest to identify the mechanisms that control the differential localization of SAPCD2 in horizontally and vertically dividing RPCs. Another key regulator and interactor of LGN is *Inscuteable* (*Insc*), which is functionally conserved in flies and mammals (Schaefer et al., 2000; Yu et al., 2000; Zigman et al., 2005). Mammalian *Insc* (*mlnsc*) localizes to the apical side of vertically dividing RPCs and is concentrated at poles and apical cortex in horizontally dividing RPCs (Zigman et al., 2005). Given that *Insc* and SAPCD2 positively and negatively regulate LGN localization, respectively, future work will be required to determine whether *mlnsc* and SAPCD2 compete for apical localization in RPCs to regulate spindle orientation, ultimately deciding horizontal versus vertical divisions of RPCs.

REFERENCES

- Cayouette, M., and Raff, M. (2003). *Development* 130, 2329–2339.
- Cayouette, M., Whitmore, A.V., Jeffery, G., and Raff, M. (2001). *J. Neurosci.* 21, 5643–5651.
- Chiu, C.W.N., Monat, C., Robitaille, M., Lacomme, M., Daulat, A.M., Macleod, G., McNeill, H., Cayouette, M., and Angers, S. (2016). *Dev. Cell* 36, this issue, 50–62.
- Du, Q., and Macara, I.G. (2004). *Cell* 119, 503–516.
- Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M., and Ahringer, J. (2003). *Curr. Biol.* 13, 1029–1037.
- Konno, D., Shioi, G., Shitamukai, A., Mori, A., Kiyonari, H., Miyata, T., and Matsuzaki, F. (2008). *Nat. Cell Biol.* 10, 93–101.
- Kotak, S., Busso, C., and Gönczy, P. (2012). *J. Cell Biol.* 199, 97–110.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Knoblich, J.A. (2000). *Curr. Biol.* 10, 353–362.
- Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X., and Chia, W. (2000). *Cell* 100, 399–409.
- Zigman, M., Cayouette, M., Charalambous, C., Schleiffer, A., Hoeller, O., Dunican, D., McCudden, C.R., Firnberg, N., Barres, B.A., Siderovski, D.P., and Knoblich, J.A. (2005). *Neuron* 48, 539–545.

Cybernetics, Redux: An Outside-In Strategy for Unraveling Cellular Function

Mohan Malleshaiah¹ and Jeremy Gunawardena^{1,*}

¹Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA

*Correspondence: jeremy_gunawardena@hms.harvard.edu

<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.025>

A new paper in *Science* reveals how repetitive stimulation can identify and help to repair fragilities within a signaling network, while using linear mathematical models inspired by engineering, thereby suggesting how cybernetic methods can be integrated into systems and synthetic biology.

Wendell Lim's laboratory at UCSF has published a report in *Science* in which repetitive pulsing of *Saccharomyces cerevisiae* cells with an osmotic shock revealed what the authors—Amir Mitchell, Ping Wei, and Wendell Lim—described as an “Achilles’ heel” in the MAP kinase signaling network (Mitchell et al., 2015). This work builds upon a long tradition of exploiting engineering ideas in biology

but also suggests how such methods can be more effectively integrated into modern systems and synthetic biology.

In trying to understand how cells work, there is a strong temptation, in the light of our accumulated molecular understanding, to pull them apart by perturbing individual components at DNA, RNA, or protein level. This “inside-out” strategy has been hugely informative—about com-

ponents. Engineering offers an alternative “outside-in” strategy, in which a system is interrogated so as to reveal how it works. This offers, in principle, a more integrative approach.

A commonly used interrogation is to vary the frequency of stimulation. A system can be fully reconstructed if its complete frequency response is known. Even the high-frequency response reveals