HAL
open science

CARACTERISATION DU RESEAU DE SIGNALISATION IMPLIQUE DANS LA MAINTENANCE ET LA PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE DU XENOPE

Pauline Cabochette

To cite this version:

Pauline Cabochette. CARACTERISATION DU RESEAU DE SIGNALISATION IMPLIQUE DANS LA MAINTENANCE ET LA PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE DU XENOPE. Biologie du développement. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA11T089 . tel-01165010

HAL Id: tel-01165010

https://theses.hal.science/tel-01165010

Submitted on 18 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS-SUD XI
ECOLE DOCTORALE 419: SIGNALISATIONS ET RESEAUX INTEGRATIFS EN BIOLOGIE
UNITE CNRS UPR3294: LABORATOIRE DE NEUROBIOLOGIE & DEVELOPPEMENT
EQUIPE CELLULES SOUCHES ET NEUROGENESE DANS LA RETINE

Thèse de Doctorat

Présentée pour l'obtention du titre de:

Docteur de l'Université Paris-Sud XI

Par:

Pauline Cabochette

CARACTERISATION DU RESEAU DE SIGNALISATION IMPLIQUE DANS LA MAINTENANCE ET LA PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE DU XENOPE

Thèse soutenue publiquement le 15 décembre 2014 devant le jury composé de:

Pr. Simon Saule	Président du Jury
Dr. Nicolas Tapon	Rapporteur
Dr. Alain Mauviel	Rapporteur
Dr. Sigolène Meilhac	Examinatrice
Dr. Fabienne Pituello	Examinatrice
Dr. Muriel Perron	Directrice de thèse
Dr. Odile Bronchain	Co-directrice de thèse

UNIVERSITE PARIS-SUD XI
ECOLE DOCTORALE 419: SIGNALISATIONS ET RESEAUX INTEGRATIFS EN BIOLOGIE
UNITE CNRS UPR3294: LABORATOIRE DE NEUROBIOLOGIE & DEVELOPPEMENT
EQUIPE CELLULES SOUCHES ET NEUROGENESE DANS LA RETINE

Thèse de Doctorat

Présentée pour l'obtention du titre de:

Docteur de l'Université Paris-Sud XI

Par:

Pauline Cabochette

CARACTERISATION DU RESEAU DE SIGNALISATION IMPLIQUE DANS LA MAINTENANCE ET LA PROLIFERATION DES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE DU XENOPE

Thèse soutenue publiquement le 15 décembre 2014 devant le jury composé de:

Pr. Simon Saule	Président du Jury
Dr. Nicolas Tapon	Rapporteur
Dr. Alain Mauviel	Rapporteur
Dr. Sigolène Meilhac	Examinatrice
Dr. Fabienne Pituello	Examinatrice
Dr. Muriel Perron	Directrice de thèse
Dr. Odile Bronchain	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude envers mes deux responsables de thèse, Muriel Perron et Odile Bronchain. Leur grande disponibilité et leurs nombreux conseils auront joué un rôle déterminant dans l'aboutissement de ce travail. Je remercie en particulier Muriel pour le temps passé sur la correction de ce manuscrit.

Je suis très reconnaissante au Pr. Simon Saule, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ma thèse, ainsi qu'à Nicolas Tapon et Alain Mauviel qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je les remercie sincèrement pour tout l'intérêt qu'ils ont porté à mon projet durant ces trois années.

Je tiens à remercier Fabienne Pituello et Sigolène Meilhac pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

J'associe à ces remerciements tous les membres de l'équipe qui, par leur aide quotidienne, ont enrichi cette thèse et contribué à faire de ces années une expérience humaine inoubliable. Je pense en particulier à Albert Chesneau (pour sa gentillesse et ses précieux conseils les jours de ponte), Christel Masson (pour ses encouragements et son aide dans les expériences de dernière minute), Guillermo Vega-Lopez (pour son aide et nos discussions sur le projet que nous avons partagé), Morgane Locker (pour ses nombreux conseils et ses précieuses relectures qui ne laissent rien passer), Johanna Hamdache et Marie-Ange Richard (pour leur aide et leur bonne humeur), mais aussi Gabriele Colozza, Jérôme Roger et Warif El Yakoubi.

Je garde un paragraphe particulier pour remercier "les filles du bureau" (désolée Rahul et Nico!) pour leur bonne humeur, leur soutien et leur humour qui ont énormément compté pendant ces trois ans: Karine Parain, Caroline Borday, Magdalena Hidalgo, Nicolas Mazurier, Rahul Langhe, Annaïg Hamon et Juliette Bitard (oui tu n'es pas officiellement dans notre bureau mais c'est comme si...).

Je tiens à remercier plus particulièrement Nico, Karine et Caroline pour leur amitié: Karine pour m'avoir rappelé qu'il n'y a pas que le labo dans la vie. Pour nos vacances, nos parties de tennis et nos pauses "thé" qui m'ont permis de décrocher de temps en temps! Nico, pour tous les bons moments que nous avons passé et pour ton humour qui m'a beaucoup aidé dans les moments difficiles (même si je ne t'ai toujours pas pardonné pour le seau d'eau!) Et enfin, Caroline Borday, qui a été ma première encadrante durant mon stage de licence et que j'ai eu un grand plaisir à retrouver durant le début de ma thèse. Ton encadrement durant ce premier stage a été déterminant dans mon choix de faire une thèse. Je ne te remercierai jamais assez pour ta confiance, ton soutien et toutes les choses que j'ai apprises à tes côtés, au niveau scientifique mais aussi humain. Malgré les moments difficiles et les soirées passées au laboratoire (voir les nuits parfois!), j'ai eu énormément de plaisir à travailler à tes côtés.

J'ai eu la chance d'effectuer en parallèle de cette thèse un monitorat à l'Université Paris XI. Cette activité d'enseignement a contribué à rendre ces trois années de thèse très épanouissantes. Je souhaite donc remercier vivement tous les étudiants que j'ai rencontrés et avec lesquels j'ai partagé de très bons moments ainsi que les différents enseignants qui m'ont donné le goût de leur métier. Un grand merci donc à Morgane Locker, Odile Bronchain, Simon Saule, Marianne Malartre, Patrick Pla, Françoise Jamen, Anne-Hélène Monsoro, François Agnès, Jean Pierre Muller et Laurent Théodore.

Enfin, ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner toutes les personnes qui m'ont accompagnée, soutenue et surtout supportée (et le mot est faible!) pendant ces années. Je pense en particulier à mes parents qui ont été très compréhensifs et qui m'ont toujours encouragée dans mes choix. Je pense aussi à mes amis que j'ai (un peu) mis de côté durant ces trois ans, j'espère pouvoir enfin vous retrouver!

Et pour finir (on garde toujours le meilleur pour la fin), mes derniers remerciements vont à Simon, sans qui cette dernière année de thèse aurait été beaucoup plus difficile. En plus de me supporter au quotidien (ce qui n'est déjà pas une mince affaire), tu as dû subir mon humeur de fin de thèse...un grand merci pour ça! Malgré tout ce que nous avons traversé cette année, tu m'as apporté beaucoup de bonheur, je suis impatiente de commencer cette nouvelle vie avec toi.

Merci à vous tous!

RESUME

Contrairement aux mammifères adultes, la rétine des amphibiens possède la particularité de croître durant toute la vie de l'animal grâce à l'activité continue d'une population de cellules souches localisée au sein d'une niche bien délimitée, la zone marginale ciliaire (ZMC). Ce modèle offre ainsi la possibilité d'étudier *in vivo* les mécanismes moléculaires à l'origine du maintien et de la prolifération des cellules souches neurales à des stades post-embryonnaires. Dans ce but, l'identification et la caractérisation des différentes voies de signalisation présentes au sein de la niche biologique des cellules souches rétiniennes est une première étape indispensable.

Mon projet de thèse a été divisé en deux objectifs principaux: l'étude des interactions entre les voies Wnt et Hedgehog au sein de la ZMC chez le xénope et la réalisation de l'étude fonctionnelle de *Yap*, l'effecteur principal de la voie de signalisation Hippo dans ce modèle.

Par des approches génétiques et pharmacologiques, la première partie de ce projet a permis de mettre en évidence un antagonisme inattendu entre les signaux Wnt et Hedgehog au sein de la ZMC qui régule l'activité proliférative des cellules souches et des progéniteurs rétiniens. Ce travail nous a conduit à proposer un modèle dans lequel ces deux voies réguleraient la balance prolifération/différenciation dans la rétine post-embryonnaire.

Dans un deuxième temps, les expériences de gain et de perte de fonction du gène *Yap* ont montré que ce dernier joue un rôle essentiel dans la régulation du programme temporel de la phase de réplication de l'ADN des cellules souches rétiniennes. En effet, l'inhibition de *Yap* entraîne une importante réduction de la durée de la phase S du cycle cellulaire associée à une instabilité génomique. Une surexpression de *c-Myc* et de la voie p53-p21 semble impliquée dans ce phénotype. Nos travaux nous ont également permis d'identifier un nouveau partenaire de YAP, le facteur de transcription PKNOX1. L'ensemble de ces données nous a ainsi conduit à proposer un modèle selon lequel le complexe YAP/PKNOX1 pourrait être nécessaire au bon déroulement de la phase de réplication des cellules souches, indispensable à la maintenance de l'intégrité du génome de ces cellules et de leur descendance.

LISTE DES ABREVIATIONS

AMOT: AngioMOTine
ANKRD1: ANKyrin Repeat Domain-containing protein 1
aPKC: Atypical Protein Kinase C
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR: Ataxia Telangiectasia and RAD3 related
BIRC5: Baculoviral IAP Repeat Containing 5
β-TrCP: β-Transducin repeat Containing Protein
CCG: Couche des Cellules Ganglionnaires
CDK: Cyclin Dependent Kinase
CK1δ/ε: Casein Kinase 1
CNE: Couche Nucléaire Externe
CNI: Couche Nucléaire Interne
CRB: Crumbs
CTGF/CCN2: Connective Tissue Growth Factor
CYR61/CCN1: CYsteine Rich angiogenic inducer 61
DCO: Disc Overgrown
DIAP1: Drosophila IAP1
DJUB: Ajuba
DLG: Discs LarGe
D-MYC: Drosophila Myc
dRASSF: Drosophila Ras aSSociation Family
DS: Dachsous
DV: Dishevelled
EFTFs: Eye Field Transcription Factors
EGF: Epidermal Growth Factor
EPR: Epithélium Pigmenté Rétinien
ESCs: Embryonic Stem Cells
EX: Expanded
FERM: 4.1/Ezrin/Radixin/Moesin
FGF: Fibroblast Growth Factor
FJ: Four Jointed
FRDM1/6: FeRM Domain containing 1/6
GPCRs: G Protein Coupled Receptors
GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3
HA: Hyaluronic Acid
H2AX: Histone 2A family member X
HPO: Hippo
HTH: Homothorax
ICM: Inner cell mass
IGF1: Insulin-like Growth Factor 1
iPSCs: Induced Pluripotent Stem Cells
I-SMAD: Inhibitory SMADs
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
KEM: Kibra-Ex-Mer
KIBRA: KIdney and BRAin
LATS: LArge Tumor Suppressor
LGL: Lethal Giant Larvae
LIF: Leukemia Inhibitor Factor
LPA: LysoPhosphatidic acid

MAD: Mothers Against Dpp
MATS: Mob-As-Tumor-Suppressor
MEIS: Myeloid Ecotropic Integration Site
MEN/SIN: Mitotic Exit Network/Septation Initiation Network
MER: Merlin
MOB1: Mps Once Binder kinase activator-like 1
MST: Mammalian STerile 20-like kinase
NDR: Nuclear Dbf2-Related
NF2: Neurofibromatosis 2
NLS: Nuclear Localization Signal
NuRD: Nucleosome Remodeling Deacetylase
OCT4: OCTamer-binding transcription factor 4
PALS1: Protein Associated with caenorhabditis elegans Lin-7 protein 1
PKNOX1: Pbx/knotted-1 homeobox
PREP1: Pbx regulating protein-1
PATJ: Pals1 Associated Tight Junction
PTC: PaTChed
PTPN14: Protein Tyrosin Phosphatase 14
RASSF: Ras ASSociation domain Family
S1P: Sphingosine-1-Phosphate
SARAH: SAv-RAssf-Hpo
SAV: SAlVador
SCF/β-TRCP: (Skp1, Cdc53, F-box proteins and β-Transducin Repeat-Containing Protein)
SCRIB: SCRIBble
SD: Scalloped
SHH: Sonic Hedgehog
SNC: Système Nerveux Central
TALE: Three Amino acid Loop Extension
TAME: Tyro-3-Axl-MEr
TAZ: Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif
TβRI: TGF-β Receptor 1
TEAD/TEF: TEA Domain family member/Transcription Enhancer Factor
VG: Vestigial
VGL4: VestiGial-Like 4)
WG: Wingless
WTS: Warts
WWC2: WW domain-Containing protein 1/2
YAP: Yes Associated Protein
YKI: Yorkie
ZMC: Zone Marginale Ciliaire

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I: LES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE DES VERTEBRES 15

1. LA RETINE 15
   1) Anatomie de l'œil 15
   2) Structure de la rétine 17
   3) Développement de la rétine 19
2. LES CELLULES SOUCHES DE LA ZONE MARGINALE CILIAIRE 23
   1) La zone marginale ciliaire chez les poissons et les amphibiens 23
   2) Les cellules souches rétiniennes adultes dans l'œil des mammifères 27
   3) Caractérisation moléculaire et cellulaire des cellules souches de la rétine adulte 33
   4) Les mécanismes impliqués dans la maintenance et la prolifération des cellules souches rétiniennes adultes 37
   5) Les processus de régénération dans la rétine 43
3. CONCLUSION 49

CHAPITRE II : LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO 51

1. LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO 51
   1) Découverte de la voie Hippo chez la drosophile 51
   2) La voie Hippo chez les mammifères 57
2. LA REGULATION DE LA VOIE HIPPO 59
   1) Le complexe Ex-Mer-Kibra 61
   2) Les complexes de polarité 63
   3) Les jonctions cellulaires 67
   4) Forces mécaniques et cytosquelette d'actine 69
   5) Les récepteurs couplés aux protéines G 73
3. LES EFFECTEURS DE LA VOIE HIPPO 77
   1) Structure de YAP et TAZ 77
   2) Les partenaires de YAP et TAZ 79
   3) Les cibles transcriptionnelles de YAP et TAZ 83
4. INTERACTIONS ENTRE LA VOIE HIPPO ET LES AUTRES VOIES DE SIGNALISATION 85
   1) Interaction entre les voies Hippo et TGF-β 85

2) Interaction entre les voies Hippo et Hedgehog 91
3) Interaction entre les voies Hippo et Wnt 93
5. ROLES DE LA VOIE HIPPO 99
1) Au cours du développement 99
2) Dans la régulation des cellules souches et des progéniteurs 103
3) Cancer et voie de signalisation Hippo 113
4) Rôle de la voie de signalisation Hippo dans le contrôle du cycle cellulaire 117
5) La voie de signalisation Hippo dans les processus de régénération 119
6. LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO DANS LE SYSTEME NERVEUX 125
1) La voie de signalisation Hippo dans le tube neural 125
2) La voie de signalisation Hippo dans la rétine 129
CHAPITRE III: OBJECTIF DE MON TRAVAIL DE THESE 137
CHAPITRE IV: MATERIELS ET METHODES 143
1. Embryons et lignée transgénique 143
2. Traitements Pharmacologiques 143
3. Morpholinos et Photo-Morpholinos inductibles 144
4. Incorporation des analogues de la thymidine 145
5. Analyse des paramètres du cycle cellulaire 147
L'indice mitotique 147
L'EdU cumulatif 147
La PLM ("Percentage of Labelled Mitotic index") 149
Calcul du T_{G1} et du T_M 149
6. Expérience de "Nanostring" 149
CHAPITRE V : RESEAU GENIQUE CONTRÔLANT LA MAINTENANCE DES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE POST-EMBRYONNAIRE : INTERACTION DES VOIES DE SIGNALISATION WNT/HEDGEHOG 155
1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE 155
2. RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS 157
1) Effets de la perturbation des voies Wnt et Hedgehog sur la prolifération dans la rétine post-embryonnaire 157
2) Détermination des territoires d'expression des ligands Wnt et Hedgehog 159
3) Effets des voies Wnt et Hedgehog sur leur activité réciproque 159
4) Identification des acteurs moléculaires à l'origine de l'inhibition réciproque des voies Wnt/Hedgehog 161
3. CONCLUSIONS 161

CHAPITRE VI : ANALYSE FONCTIONNELLE DE YAP DANS LES CELLULES SOUCHES ET LES PROGENITEURS DE LA RETINE POST-EMBRYONNAIRE 185

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE 185
2. RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS 187
   1) Analyse de l'expression des composants de la voie de signalisation Hippo dans la rétine post-embryonnaire 187
   2) Etude du rôle de *Yap* dans les cellules souches de la rétine post-embryonnaire 187
   3) Identification des partenaires de YAP dans la rétine post-embryonnaire 193
3. CONCLUSION 195

CHAPITRE VII: DISCUSSION ET PERSPECTIVES 245

1. L'interaction des voies Wnt et Hedgehog dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation dans la rétine post-embryonnaire 245
   1) Mise en évidence d'une interaction antagoniste entre les voies Wnt et Hedgehog dans la rétine post-embryonnaire 245
   2) Les voies Wnt et Hedgehog possèdent des effets opposés sur la sortie du cycle cellulaire 247
   3) *Sfrp1* et *Gli3* sont des acteurs moléculaires essentiels de l'interaction entre les voies de signalisation Wnt et Hedgehog 247
   4) Conclusion 249
2. Rôle de l'effecteur de la voie hippo, *Yap*, dans les cellules souches de la retine post-embryonnaire 251
   1) Le gène *Yap*: un nouveau marqueur de cellules souches 251
   2) Le gène *Yap*: un gène nécessaire au contrôle du "timing" de la phase S du cycle cellulaire des cellules souches de la rétine post-embryonnaire 253
   3) L'inhibition de *Yap* est à l'origine de stress réplicatif important 259
   4) PKNOX1 est un nouveau partenaire de YAP dans les cellules souches de la rétine post-embryonnaire. 261
   5) Conclusion 267

CHAPITRE VIII: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 269

ANNEXES 271

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 291

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Schéma d'une coupe transversale de l'œil humain adulte. 16
Figure 2: Organisation des neurones de la rétine..... 16
Figure 3: Représentation schématique du développement embryonnaire de la rétine. 18
Figure 4: Régionalisation de la vésicule optique..... 18
Figure 5: Ordre de naissance des différents types cellulaires rétiniens..... 20
Figure 6: Les cellules souches de la rétine chez le poisson. 24
Figure 7: Organisation de la ZMC chez le Xénope. 24
Figure 8: Figure 8: Représentation schématique de la partie périphérique de la rétine neurale et du corps ciliaire chez les primates. 26
Figure 9: Le corps ciliaire dans l'œil de souris adulte..... 28
Figure 10: Tableau récapitulatif des 18 marqueurs de cellules souches rétiniennes identifiés chez le xénope... 34
Figure 11: Propriétés des cellules souches de la ZMC. 36
Figure 12: Modèle de l'ontogenèse des cellules souches de la ZMC chez le xénope. 36
Figure 13: Régénération de la rétine via la trans-différenciation de l'EPR chez le xénope. 42
Figure 14: Les principales sources cellulaires à l'origine de la régénération de la rétine chez différentes espèces. 44
Figure 15: Phénotype des clones homozygotes mutants pour *Wts* chez la drosophile.. 50
Figure 16: Phénotypes mutants des différents membres de la voie Hippo.. 50
Figure 17: Schéma représentatif des interactions clés entre les composants du cœur de la voie Hippo. 52
Figure 18: La surexpression de *Yki* provoque un phénotype d'excès de croissance dans les disques imaginaux d'aile chez la drosophile 52
Figure 19: La signalisation *Fat-Ds* contrôle la taille et la forme des pattes chez la drosophile 54
Figure 20: La voie de signalisation Hippo chez la drosophile. 54
Figure 21: Les homologues des composants de la voie Hippo chez les mammifères. 56
Figure 22: La voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères. 58
Figure 23: Interactions entre le complexe KEM et la cascade Hippo chez la drosophile 60
Figure 24: Modèle de la régulation de l'activité de YAP/TAZ par les protéines AMOTs..... 60
Figure 25: Illustration du mécanisme d'action de la protéine MER chez les mammifères..... 62
Figure 26: Régulation de la voie Hippo par le complexe Crumbs chez la drosophile..... 62
Figure 27: Modèle de régulation de la voie Hippo par la protéine CRB. 64
Figure 28: Régulation de la voie Hippo par les complexes de polarité chez les mammifères 64
Figure 29: Régulation de la voie Hippo par les composants des jonctions adhérentes 66
Figure 30: YAP/TAZ sont des capteurs des propriétés mécaniques des cellules et de l'environnement. 68
Figure 31: Régulation de l'activité de YAP/TAZ/YKI par le cytosquelette d'actine..... 68
Figure 32: Représentation schématique de la voie canonique et non canonique de la voie Hippo 70
Figure 33: Régulation de la voie Hippo par le cytosquelette d'actine et les GPCRs..... 72
Figure 34: La régulation de la kinase LATS par les différents GPCRs..... 72
Figure 35: Schéma de l'ensemble de la régulation de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères 74
Figure 36: Représentation schématique de la structure des deux isoformes principales de la protéine YAP..... 76
Figure 37: Représentation schématique des 4 isoformes de YAP1 et des 4 isoformes de YAP2 76
Figure 38: Structure de la protéine YAP chez le xénope. 78
Figure 39: Structure protéique des effecteurs YAP/TAZ/YKI. 78
Figure 40: Schéma représentatif du mécanisme de compétition entre YKI/YAP et TGI/VGL4 80
Figure 41: Interactions protéiques de YAP et TAZ 80

Figure 42: Schéma représentatif du modèle de fonctionnement de TAZ/YAP dans la voie TGF-β /SMAD. 86
Figure 43: Modèle d'interaction de YAP/TAZ avec le complexe SMAD2/3/4 dans le contrôle de la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines. 88
Figure 44: Modèle de l'interaction de YAP/TAZ/TEAD et des facteurs SMADs dans les cellules du cancer du sein. 88
Figure 45: Modèle d'interaction hypothétique entre les voies Hippo et Hedgehog dans les médullobastomes 90
Figure 46: Modèle de l'interaction entre les voies Hippo et Hedgehog. 90
Figure 47: Interaction entre les voies de signalisation Wnt et Hippo 92
Figure 48: Modèle d'intégration de YAP/TAZ au sein de la voie de signalisation Wnt. 96
Figure 49: Le complexe β-caténine-YAP-TBX5 est essentiel au maintien de certaines lignées cellulaires cancéreuses. 96
Figure 50: Localisation dynamique de YAP/TAZ au stade blastocyste chez la souris. 98
Figure 51: Rôle de la voie de signalisation Hippo dans la régulation de la croissance au cours du développement. 100
Figure 52: Rôle de YAP dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. 108
Figure 53: Rôle de YAP dans les progéniteurs hépatiques 110
Figure 54: Phénotype obtenus par l'inactivation de la cascade de kinases Hippo chez la drosophile et la souris 112
Figure 55: YAP/TAZ contrôlent plusieurs propriétés cellulaires responsable du développement de cancers mais aussi nécessaire à l'activité des cellules souches. 114
Figure 56: Rôles de YAP au cours de la progression tumorale et de la formation des métastases. 114
Figure 57: Comparaison de la voie MEN/SIN et de la voie Hippo dans la régulation de la mitose 116
Figure 58: Rôle de la voie de signalisation Hippo dans les cellules tétraploïdes 116
Figure 59: Rôle de YAP dans la régénération de l'intestin chez les mammifères 118
Figure 60: YKI dans la régénération intestinale chez la drosophile 120
Figure 61: Rôle de la voie de signalisation Hippo dans les processus de régénération du tissu cardiaque. 122
Figure 62: La voie de signalisation BMP2/SMAD inhibe la prolifération des cellules souches neurales embryonnaires en contrôlant négativement le complexe YAP/TEAD. 126
Figure 63: Expression de *Yap* au cours du développement précoce chez la souris. 128
Figure 64: Rôle de la voie Hippo dans la balance prolifération/différenciation des photorécepteurs 132
Figure 65: Schéma de la construction "pbin8LefdGFP" rapportrice de l'activité Wnt. 144
Figure 66: Graphique obtenu après une expérience d'EdU cumulatif. 146
Figure 67: Graphique obtenu après une expérience de PML. 148
Figure 68: Technique du "Nanostring". 148
Figure 69: Liste des gènes cibles analysés dans les expériences de Nanostring. 150
Figure 70: Patron d'expresssion des différents composants de la voie de signalisation Hippo chez *Xenopus laevis* 186
Figure 71: Organisation des foyers de réplication au cours de la phase S du cycle cellulaire. 190
Figure 72: Organisation générale de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. 190
Figure 73: Modèle de l'interaction entre les voies Wnt et Hedgehog dans la rétine post-embryonnaire du xénope. 246
Figure 74: Expression de *Yap* dans la crypte intestinal chez la souris. 250
Figure 75: Localisation de la protéine YAP dans la rétine post-embryonnaire du xénope. 250
Figure 76: Exemple de programme temporel de la réplication chez les mammifères. 254
Figure 77: Représentation schématique des trois principaux profils de réplication au cours de la phase S chez les mammifères. 254
Figure 78: Modèle hypothétique permettant d'expliquer le programme temporel de la réplication. 256
Figure 79: Schéma simplifié de la voie p53/p21. 258
Figure 80: Phénotype de perte de fonction *Pknox1*. 262

Figure 81: Modèle hypothètique représentant les interactions entre PKNOX1-PBX1 et SMAD3 dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse..... 264
Figure 82: Modèles hypothétiques représentant le rôle du complexe YAP/PKNOX dans la régulation du "timing" de la phase S des cellules souches de la ZMC 266
Figure 83: Structure du cycle cellulaire des cellules souches embryonnaires indifférenciées et différenciées . 266
Figure 84: Schéma récapitulatif des interactions existantes entre YAP/TAZ et les autres voies de signalisation 268

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I: Les cellules souches de la rétine des vertébrés

Chapitre II: La voie de signalisation Hippo

CHAPITRE I: LES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE DES VERTEBRES

1. LA RETINE

La rétine des vertébrés est une structure laminaire qui tapisse le fond de l'œil et qui permet la capture et la conversion de l'information lumineuse en signaux électriques. De part son accessibilité par rapport au système nerveux central (SNC), la rétine est un excellent modèle pour l'étude de la neurogenèse. De plus, l'organisation de cet organe ainsi que les mécanismes qui contrôlent son développement sont très bien conservés chez les vertébrés. Dans cette première partie, j'ai choisi de décrire très brièvement l'anatomie de l'œil afin de définir les différentes structures dont je fais référence dans la suite du manuscrit ainsi que le développement de la rétine.

1) Anatomie de l'œil

L'œil des vertébrés est un organe complexe dont les composants possèdent plusieurs origines embryonnaires bien distinctes: la cornée et le cristallin ont pour origine l'épiderme de surface, la rétine, le neurectoderme et les muscles ciliaires et oculaires le mésoderme. L'œil est une sphère remplie de liquide et entourée de trois couches de tissus ou tuniques. Seule la couche la plus interne, **la rétine**, contient des neurones sensibles à la lumière, capables de transmettre les signaux visuels au cerveau. La couche qui lui est immédiatement adjacente, **la tunique uvéale** ou uvée, comporte trois structures distinctes mais reliées entre elles formant un tissu continu. L'élément le plus important de l'uvée est la choroïde, composée d'un important réseau de capillaires, source principale de l'approvisionnement en sang des cellules rétiniennes. Vers l'avant de l'œil, le prolongement de la choroïde est appelé le corps ciliaire. C'est une structure en anneau qui entoure le cristallin et qui comporte une composante musculaire permettant l'ajustement de la puissance réfringente du cristallin ainsi qu'une composante vasculaire qui sécrète le liquide de la partie antérieure de l'œil. L'élément le plus antérieur de l'uvée est l'iris, partie colorée de l'œil que l'on peut voir à travers la cornée. Ce tissu comprend deux groupes de muscles aux actions opposées qui permettent d'ajuster la taille de la pupille (l'ouverture située au centre de l'iris). Enfin, la couche la plus externe de l'œil est composée d'un tissu résistant de couleur blanche, **la sclérotique**. A l'avant de l'œil, cette structure opaque se transforme en un tissu transparent, la cornée, laissant la lumière entrer dans l'œil (Figure 1).

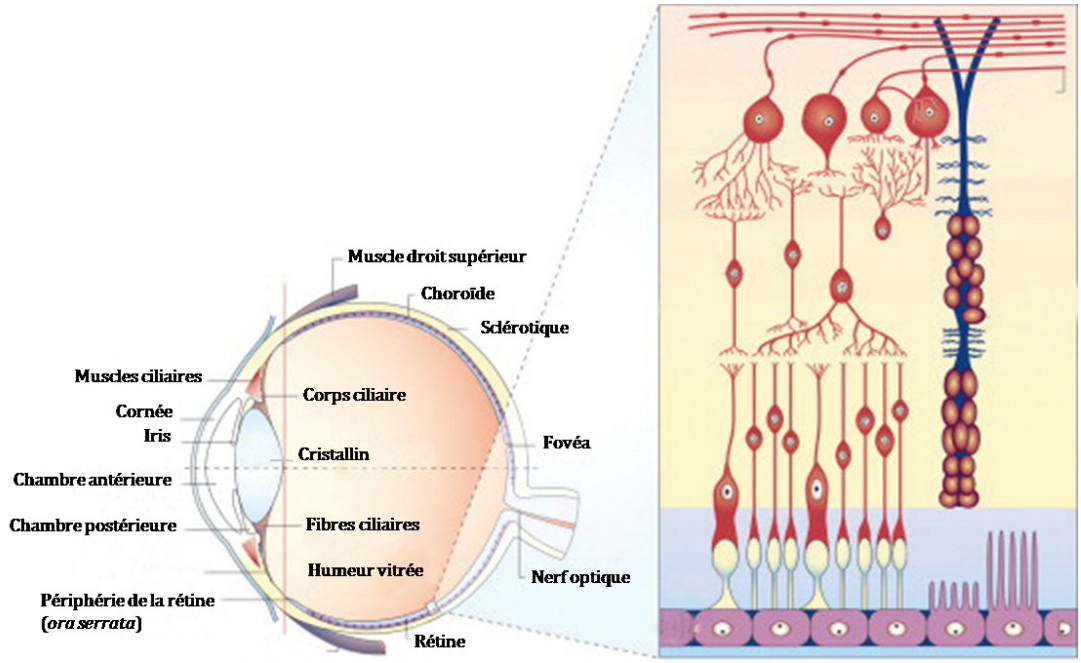


Figure 1: Schéma d'une coupe transversale de l'œil humain adulte: (**A gauche**) Coupe sagittale schématique d'un œil humain adulte. Cette illustration montre les principaux tissus de l'œil humain. La ligne verticale divise le segment antérieur de l'œil (la cornée, le cristallin, l'iris, et le corps ciliaire) du segment postérieur (composé principalement de l'humeur vitrée, la rétine et la choroïde). La lumière pénètre l'œil à travers la cornée, la chambre antérieure et le cristallin. Avant d'atteindre la rétine, les rayons lumineux passent à travers le corps vitré. (**A droite**) Agrandissement du tissu rétinien. Adapté de (Graw, 2010).

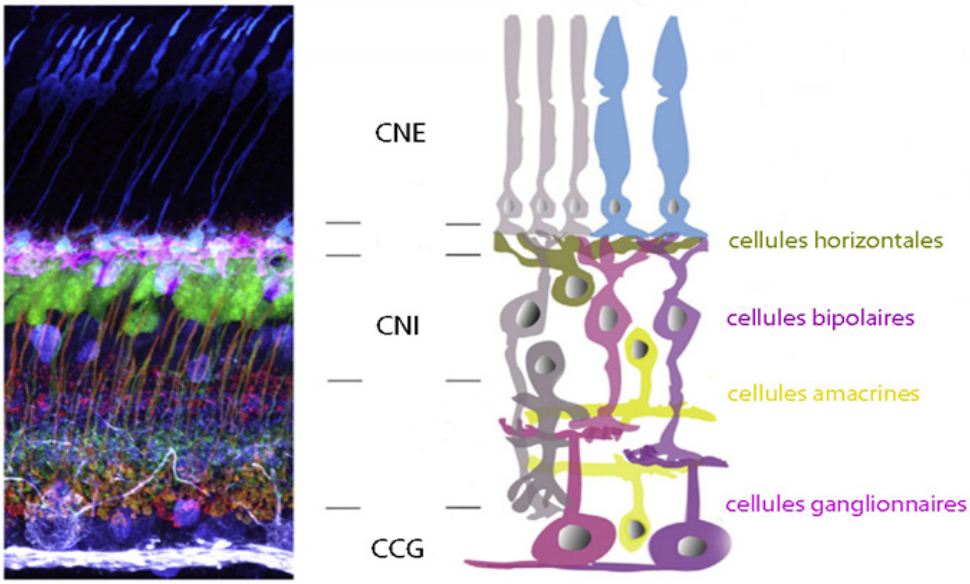


Figure 2: Organisation des neurones de la rétine: Organisation schématique des neurones dans la rétine des vertébrés. (**A gauche**) Coupe transversale d'une rétine de souris sur laquelle un immunomarquage des principaux types cellulaires a été réalisé. Les cônes sont marqués en bleu (anticorps anti-Arrestine), les cellules horizontales en rose (anticorps anti-Calbindine), la terminaison des cellules bipolaires en rouge (anticorps anti-Synatotagmine 2 et anti-PKC), les cellules amacrines en violet (anticorps anti-Calretinine) et les cellules ganglionnaires en blanc (SMI-32). Ces immuno-marquages ont été réalisés sur des coupes de souris transgéniques chez lesquelles un sous-type de cellules bipolaires expriment une protéine fluorescente jaune (vert sur l'image).(**A droite**) Schéma de la rétine montrant l'organisation des neurones dans la rétine des vertébrés. CCG: couche de cellules ganglionnaires; CNI: couche nucléaire interne; CNE: couche nucléaire externe. D'après (Hoon et al., 2014).

En arrière de la cornée, les rayons lumineux traversent les deux milieux liquides de l'œil avant d'atteindre la rétine: **l'humeur aqueuse**, liquide limpide situé dans la chambre antérieure de l'œil et **l'humeur vitrée**, un liquide plus épais situé entre l'arrière du cristallin et la rétine (Figure 1). L'humeur aqueuse est sécrétée par le corps ciliaire dans la chambre postérieure de l'œil, entre le cristallin et l'iris. Elle s'écoule ensuite dans la chambre antérieure, entre la cornée et le cristallin au niveau de la pupille. Elle apporte les nutriments nécessaires à ces deux structures. Le deuxième milieu liquide, l'humeur vitrée, représente 80% du volume de l'œil. Elle contribue à maintenir la forme de l'œil et contient des cellules, qui par leur activité phagocytaire, font disparaître le sang et les autres débris qui pourraient interférer avec la transmission de la lumière.

2) Structure de la rétine

Comme décrit précédemment, la rétine est la seule tunique de l'œil contenant une population de neurones capables de transmettre l'information visuelle au cerveau. On distingue **la rétine pigmentaire** ou **EPR** (épithélium pigmenté rétinien), un épithélium constitué d'une monocouche de cellules qui repose sur la choroïde, et la **neurorétine** qui repose sur la rétine pigmentaire. C'est la neurorétine, constituée de différentes couches de neurones, qui permet de traduire et de véhiculer le signal lumineux en influx nerveux jusqu'au cerveau. Cette dernière contient sept types cellulaires majeurs (6 types de neurones et un type de cellules gliales) répartis dans trois couches nucléaires (Figure 2). Les photorécepteurs constituent la couche la plus externe, nommée **couche nucléaire externe** (CNE), où l'énergie lumineuse est convertie en signal électrique. Les cellules ganglionnaires forment la couche la plus proche du cristallin, appelée simplement **la couche des cellules ganglionnaires** (CCG). Les cellules ganglionnaires sont les seuls neurones rétiniens qui projettent leurs axones à l'extérieur de l'œil en formant le nerf optique, dans le but de transmettre l'information au cerveau. Enfin, les corps cellulaires des quatre types de neurones restant, les cellules bipolaires, horizontales et amacrines, ainsi que les cellules gliales de Müller, sont regroupés dans la couche intermédiaire nommée **couche nucléaire interne** (CNI) localisée entre la CNE et la CCG. Quelques cellules amacrines appelées "displaced amacrine" sont également retrouvées dans la CCG. Les cellules bipolaires sont responsables de la transmission du signal nerveux des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires. Les cellules horizontales sont en contact avec les photorécepteurs alors que les cellules amacrines sont orientées dans le sens opposé, connectées aux cellules ganglionnaires (Figure 2).

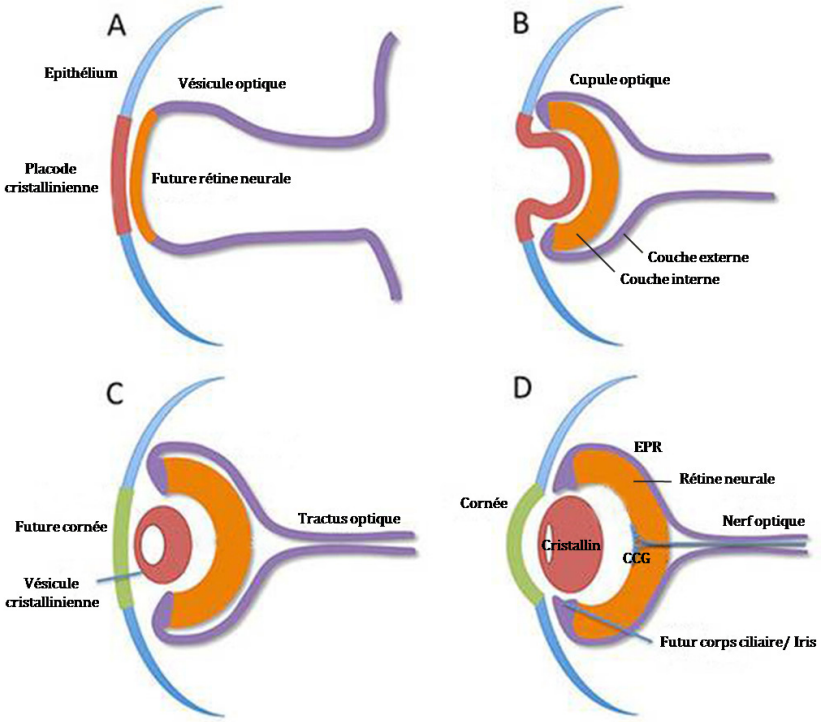


Figure 3: Représentation schématique du développement embryonnaire de la rétine. (**A**) La vésicule optique (en violet) s'évagine à partir du diencéphale. L'ectoderme de surface s'épaissit pour devenir la placode cristallinienne (en rouge). (**B**) L'invagination de la placode cristallinienne avec le neuro-épithélium sous-jacent de la vésicule optique (en orange) aboutit à la formation de la cupule optique. La couche interne de la cupule optique bistratifiée formera la future rétine neurale (en orange) alors que la couche externe donnera l'EPR (en violet). (**C**) La placode cristallinienne est totalement invaginée et forme la vésicule cristallinienne. (**D**) Après différenciation, la vésicule cristallinienne forme le cristallin et l'ectoderme de surface situé au-dessus forme la cornée. Adapté du site du laboratoire "Developmental genetics of eye development-The Brown Lab"(https://basicscience.ucdmc.ucdavis.edu).

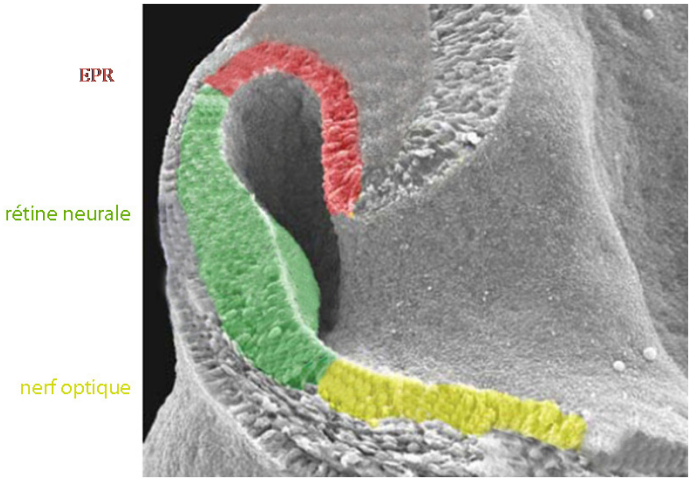


Figure 4: Régionalisation de la vésicule optique. La vésicule optique est régionalisée avec l'EPR présomptif (en rouge), le futur nerf optique (en jaune) et la future rétine neurale (en vert). La partie dorsale est en haut et la partie distale et à gauche. Adapté de (Heavner & Pevny, 2012).

Ces deux types cellulaires permettent de moduler le signal électrique envoyé aux cellules ganglionnaires. Bien que la rétine ne possède que six types cellulaires majeurs, il existe en fait une très grande variété de sous-types cellulaires au sein de chaque type neuronal. Des études détaillées des morphologies cellulaires et des caractéristiques biochimiques des neurones de la rétine mettent en évidence une grande diversité à l'intérieur de certaines classes, notamment au niveau des cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires (Masland, 2001)(Wässle, 2004).

3) Développement de la rétine

L'étude des mécanismes moléculaires qui dirigent le développement embryonnaire précoce nécessite l'utilisation d'organismes adaptés aux manipulations expérimentales. Parmi ces modèles, l'embryon de xénope (*Xenopus laevis*) est utilisé en biologie du développement depuis de nombreuses années. Ce modèle présente en effet beaucoup d'avantages dont un développement rapide et externe des œufs permettant un accès à l'ensemble des stades de développement. Le modèle du xénope a ainsi permis de mettre en évidence des mécanismes fondamentaux de détermination, spécification ou encore d'induction que l'on retrouve dans de nombreux processus développementaux dont la rétinogenèse. Chez le xénope comme chez tous les vertébrés, la spécification des champs optiques se déroule très tôt au cours du développement, dans la partie antérieure de la plaque neurale (Li et al., 1997). Les cellules des champs optiques expriment un ensemble de facteurs de transcription très conservé, nommé EFTFs (Eye Field Transcription Factors) (Moore et al., 2004)(Zaghloul et al., 2005)(H.-S. Lee et al., 2006). Chez les mammifères, ces facteurs sont les gènes *Pax6*, *Rax*, *Six3* et *Lhx2*. Ensemble, ils constituent un réseau de régulation essentiel au développement des yeux (Zuber et al., 2003). Le développement des structures oculaires débute avec la formation des vésicules optiques dès la fin de la neurulation. L'évagination du diencéphale aboutit à la formation des vésicules optiques primitives puis secondaires. Ces dernières se trouvent en contact étroit avec l'ectoderme de surface. Ce contact induit des signaux responsables de la formation d'un épaississement de l'épithélium cristallinien appelé placode cristallinienne (Figure 3A). A ce stade, chaque vésicule optique est constituée de cellules souches et de progéniteurs rétiniens qui formeront tous les dérivés neuro-ectodermique des yeux. Le destin cellulaire des différentes régions de la vésicule optique est déjà défini avec la future rétine neurale, l'épithélium pigmenté rétinien présomptif (EPR) et le futur nerf optique (Figure 4).

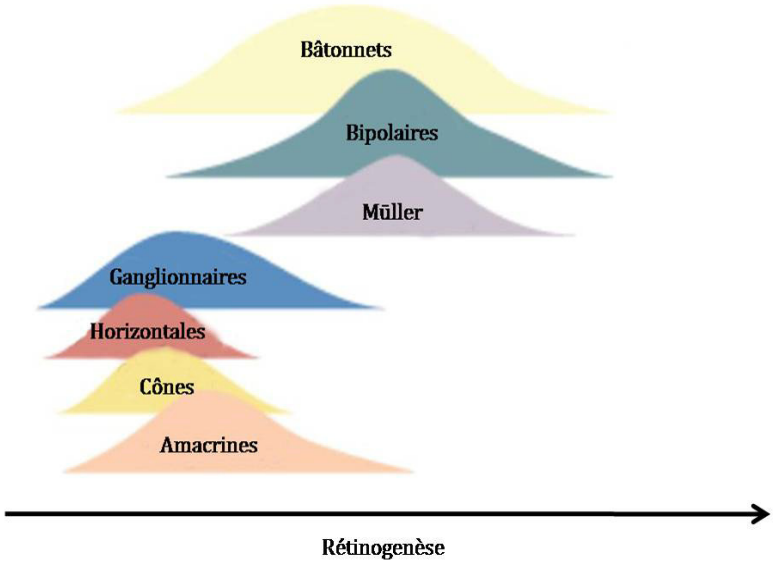


Figure 5: Ordre de naissance des différents types cellulaires rétiniens. Représentation schématique de la genèse des différents types cellulaires rétiniens. Cet ordre est conservé chez tous les vertébrés. Les cellules ganglionnaires sont les premières à se différencier et les cellules de Müller les dernières. Adapté de (Marquardt & Gruss, 2002).

En effet, chaque compartiment exprime un ensemble de facteurs de transcription spécifiques, essentiel au développement des différents types cellulaires et permettant de créer des frontières entre les différentes régions de la vésicule optique. Après la formation des vésicules optiques, une invagination coordonnée de la placode cristallinienne et de la vésicule optique forme les vésicules des futurs cristallins et les cupules optiques (Figure 3B). Les mécanismes à l'origine de cette invagination de la vésicule optique restent encore controversés. Alors qu'il était admis que la placode cristallinienne était indispensable à ce mouvement d'invagination, une équipe japonaise à réussi à former une rétine *in vitro* en l'absence d'épiderme de surface (Eiraku & Sasai, 2012). La cupule optique est formée de deux couches, la plus interne formera la future rétine neurale alors que la couche externe sera à l'origine de l'EPR présomptif (Figure 3C). Une deuxième invagination se produit dans la partie ventrale de la vésicule optique pour former la fissure optique où passeront les axones des cellules ganglionnaires pour former le nerf optique. Cette structure permet également l'entrée de l'artère hyaloïde, responsable de l'irrigation sanguine de la rétine (Saint-Geniez & D'Amore, 2004). La croissance de la cupule optique entraîne ensuite la fermeture de cette fissure optique. Au sein de la rétine neurale, les progéniteurs rétiniens se divisent de façon symétrique et asymétrique afin de produire à la fois des cellules post-mitotiques et des progéniteurs. Des expériences de lignages ont montré que les cellules progénitrices de la rétine restent multipotentes et peuvent générer tous les types cellulaires au cours du développement (Holt, Bertsch, & Harris, 1988). Malgré la persistance de la multipotentialité de ces cellules, les progéniteurs rétiniens vont préférer se différencier en un ou plusieurs types cellulaires à chaque stade de développement (Cepko et al. 1996). Ainsi, la transplantation d'un jeune progéniteur ou d'un progéniteur plus âgé dans un environnement similaire ne donnera pas la même descendance (T. Watanabe & Raff, 1990)(Morrow, Belliveau, & Cepko, 1998)(Belliveau & Cepko, 1999). Les corps cellulaires des cellules post-mitotiques sont transloqués au sein des différentes couches de la rétine. Les différents progéniteurs vont se différencier dans un ordre bien précis. Une première vague de différenciation précoce est caractérisée par la formation des cellules ganglionnaires, des cônes, des cellules horizontales et des cellules amacrines. Plus tardivement, une seconde vague aboutît à la différenciation des bâtonnets, des cellules bipolaires et enfin des cellules gliales de Müller (Figure 5)(Wong & Rapaport, 2009)(Straznicky & Gaze, 1971)(Livesey & Cepko, 2001).

2. LES CELLULES SOUCHES DE LA ZONE MARGINALE CILIAIRE

La zone marginale ciliaire (ZMC) est un anneau de cellules localisé à la périphérie de la rétine mâture contenant les cellules souches et les progéniteurs rétiniens. Les neurones rétiniens sont ajoutés progressivement à la rétine neurale grâce à la différenciation des précurseurs descendant des cellules de cette zone (Straznicky & Gaze, 1971)(Hollyfield et al. 1971). Chez les poissons et les amphibiens, une importante proportion de la rétine neurale est formée à partir des cellules de la ZMC après la différenciation initiale du neuro-épithélium rétinien. Les oiseaux possèdent également une ZMC mais qui possède un potentiel de prolifération transitoire après l'éclosion. Enfin, la rétine des mammifères ne possède pas de ZMC comparable à celle des amphibiens et des poissons dans sa région périphérique mais plusieurs sources de cellules possédant des caractéristiques de cellules souches *in vitro* ont été identifiées au sein de l'œil des mammifères. Cette partie a pour objectif de décrire la ZMC et les autres sources de cellules souches et de progéniteurs de la rétine dans ces différents modèles biologiques au cours du développement post-embryonnaire et durant les processus de régénération.

1) La zone marginale ciliaire chez les poissons et les amphibiens

Chez les mammifères, les deux structures fonctionnelles de la rétine, la rétine neurale et l'EPR, achèvent leur développement très tôt après la naissance. Après cette période, la croissance de la rétine s'arrête et cette dernière n'est pas capable de régénérer en cas de lésion. Au contraire, la rétine des poissons et des amphibiens continue de croître durant toute la vie de ces animaux et possède des propriétés régénératives importantes (Reh & Constantine-Paton 1983)(Perron et al. 1998)(Yoshii et al. 2007)(Wetts, Serbedzija, & Fraser, 1989). Cette croissance continue est possible grâce à l'activité des cellules souches rétiniennes localisées dans la ZMC. Ces cellules souches sont multipotentes et leur prolifération est responsable de l'augmentation de la taille de l'œil durant toute la vie de l'animal. Dès 1968, des expériences d'autoradiographie utilisant des marqueurs comme la thymidine ^{3}H montre que de nouvelles cellules sont produites et constamment ajoutées à partir de la ZMC dans les différentes couches de la rétine neurale (Hollyfield, 1968)(Straznicky & Gaze, 1971). De plus, des expériences de lignages réalisées chez le têtard ont montré qu'une seule cellule de la ZMC pouvait générer de large clones contenant tous les types cellulaires de la rétine, montrant la multipotence de ces cellules (Wetts et al., 1989).

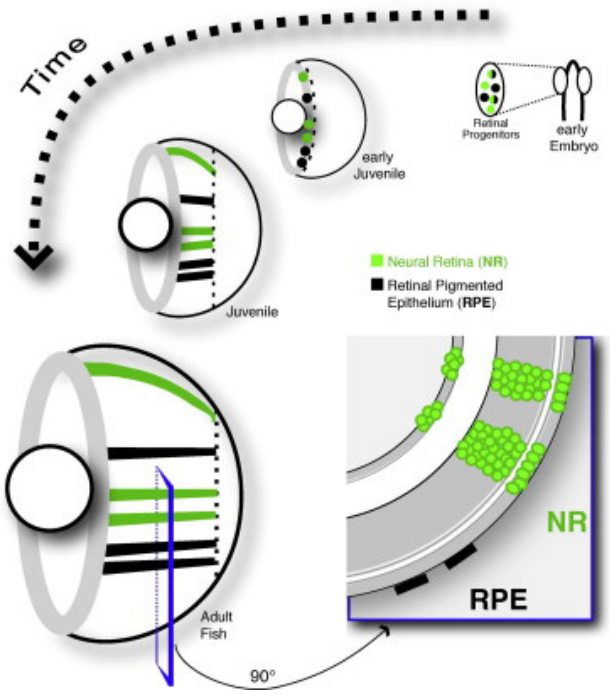


Figure 6: Les cellules souches de la rétine chez le poisson. Des cellules fluorescentes provenant d'embryons transgéniques exprimant l'EGFP de façon permanente et ubiquitaire sont transplantées dans un embryon de Médaka non marqué au stade blastula. Cette technique permet d'obtenir des rétines mosaïques contenant un nombre limité de cellules marquées. Bien que la plupart des cellules transplantées participent au développement de la rétine et acquièrent ensuite une identité post-mitotique, ces expériences de transplantation aboutissent également à l'incorporation de cellules fluorescentes au sein de la ZMC. Les embryons présentant ce profil sont analysés sur plusieurs durées allant de 6 semaines à 1 an. La descendance de ces cellules forment des clones qui continuent de s'étendre continuellement durant la vie de l'animal et qui sont composés de tous les types cellulaires rétiniens. Cette observation démontre la présence de cellules souches rétiniennes multipotentes capables de s'auto-renouveler. D'après (Centanin, Hoeckendorf, & Wittbrodt, 2011).

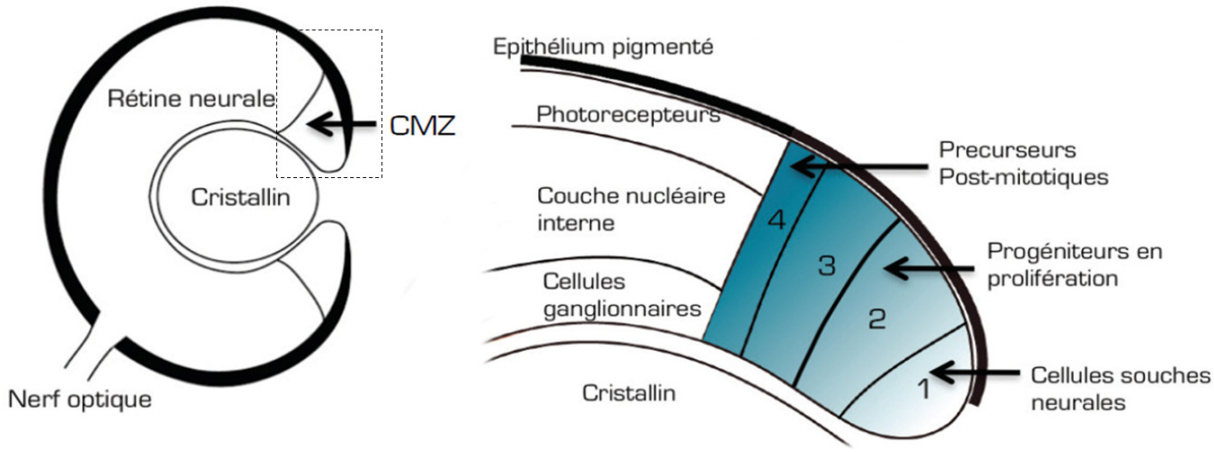


Figure 7: Organisation de la ZMC chez le Xénope. (**A gauche**) Schéma d'une coupe transversale de rétine de têtard montrant la localisation de la ZMC dans la région périphérique de la rétine neurale. (**A droite**) Agrandissement de la ZMC où se déroule la neurogenèse post-embryonnaire. La ZMC est organisée en plusieurs zones récapitulant les différentes étapes du développement de la rétine. Les cellules souches sont confinées dans la zone 1, les progéniteurs dans la zone 2 et 3 et les cellules post-mitotiques en zone 4. Adapté de (Perron et al., 1998).

Plus récemment, une équipe a réalisé pour la première fois, une expérience de lignage chez le poisson sur une très longue période, afin de véritablement démontrer les propriétés "souches" de ces cellules (Centanin et al., 2011)(Centanin et al., 2014). La transplantation de ces cellules marquées de façon permanente a en effet permis de suivre leur descendance et ainsi de démontrer les capacités d'auto-renouvellement et de multipotence de ces cellules (Figure 6). Chez les amphibiens, l'organisation spatiale de la ZMC a été décrite comme reflétant les différentes étapes de la rétinogenèse embryonnaire grâce à l'expression de différents marqueurs. En effet, les cellules souches se situent dans la partie la plus périphérique de la ZMC, suivies des cellules progénitrices en prolifération et des cellules post-mitotiques en cours de différenciation plus centralement (Figure 7)(Perron et al., 1998). Les cellules souches de la première zone possèdent bien une identité "rétine", elles expriment les différents facteurs de transcription nécessaire à la formation des champs optiques comme *Six3*, *Rx1* et *Pax6*, mais n'expriment aucun gènes neurogéniques ou proneuraux. De plus, certains gènes ont été décrits comme spécifiquement exprimés dans la zone des cellules souches comme les composants de la voie de signalisation Hedgehog, *Gli2*, *Gli3* et *Smoothened* (Perron et al. 2003) ou plus récemment le gène *Hes4* qui a été utilisé pour suivre l'origine de ces cellules durant la rétinogenèse embryonnaire (El Yakoubi et al., 2012). J'ai choisi de décrire plus en détails l'ensemble de ces marqueurs dans la partie 3.1 de ce chapitre. Les cellules souches rétiniennes prolifèrent lentement (Xue & Harris, 2012) et sont multipotentes puisqu'elles peuvent produire tous les types cellulaires neuraux et non-neuraux de la rétine. Les progéniteurs en prolifération de la deuxième zone expriment des gènes neurogéniques comme *Notch1*, *Delta1*, *ESR1*, et *ESR3* responsable de la détermination neuronale aussi bien que des gènes proneuraux comme *Ascl1*. Ces cellules prolifèrent plus rapidement et leurs descendances expriment d'autres gènes proneuraux comme *Ath3*, *Atoh7*, *NeuroD*, *Otx2* et *MyT1* impliqués dans la détermination d'un type cellulaire particulier. *Atoh7* est par exemple essentiel à la détermination des cellules ganglionnaires alors que *Neuro D* est impliqué dans celle des cellules amacrines. Les cellules de la dernière zone sortent du cycle cellulaire avant de débuter leur différenciation et de s'intégrer aux différentes couches de la rétine neurale (Perron et al. 1998). La ZMC des poissons possède une organisation similaire à celle des amphibiens bien que leurs activités ne soient pas complètement identiques (P. F. Hitchcock & Raymond, 1992). Chez cette espèce, tous les types de neurones rétiniens sont ajoutés à partir de la ZMC à l'exception des bâtonnets, un sous-type de photorécepteurs. Ces derniers sont en effet continuellement générés à partir des cellules gliales de Müller localisées dans la rétine centrale (Bernardos et al. 2007). En contexte physiologique, la rétine des poissons contient donc deux niches, l'une formée

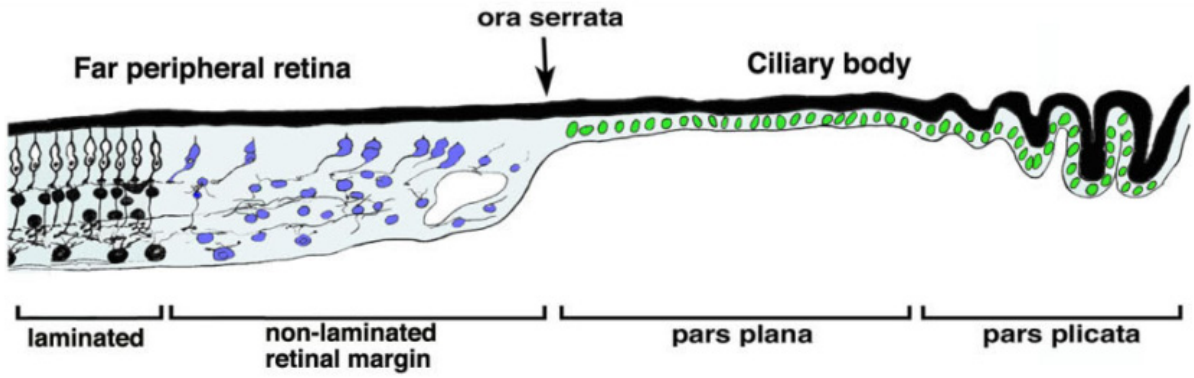


Figure 8: Représentation schématique de la partie périphérique de la rétine neurale et du corps ciliaire chez les primates. Le schéma montre la structure de la partie la plus antérieure de la rétine périphérique en contact avec le corps ciliaire chez le singe. Les deux tissus sont délimités par l'*ora serrata.* D'après (Martínez-Navarrete et al. 2008).

par les cellules souches à la périphérie de la ZMC et l'autre par une sous-population de cellules de Müller possédant un cycle cellulaire très lent au sein de la rétine neurale.

2) Les cellules souches rétiniennes adultes dans l'œil des mammifères

La recherche d'une structure similaire à la ZMC chez d'autres vertébrés, comme les oiseaux ou encore les mammifères a fait l'objet de nombreuses études afin de comprendre l'évolution de cette structure et son implication potentielle dans le support de la neurogenèse adulte. En 2000, une région comparable à une ZMC a été identifiée dans la rétine après éclosion chez le poulet (Fischer & Reh, 2000). Les auteurs de cette étude ont montré que cette zone contient des progéniteurs capables de générer des neurones rétiniens jusqu'à trois semaines après l'éclosion. Cette activité proliférative est donc seulement transitoire par rapport aux cellules de la ZMC des poissons et des amphibiens mais aussi très limitée puisque ces progéniteurs ne peuvent donner que des cellules amacrines et bipolaires (Fischer & Reh, 2000). Des recherches similaires ont également été menées chez les mammifères mais aucune ZMC comparable n'a pu être clairement identifiée chez la souris. Cependant, une situation similaire à celle observée chez les oiseaux a été décrite chez les nouveaux nés de marsupiaux âgés de quelques semaines (Kubota et al., 2002). Bien que l'activité proliférative de ces cellules se limite à quelques cellules en mitose, ce résultat suggère que ces mammifères partagent certaines similarités avec les oiseaux, les poissons et les amphibiens. La rétine de jeunes primates semble également contenir une zone de type "ZMC" (Fischer, Hendrickson, & Reh, 2001)(Bhatia et al., 2010). L'analyse structurale de la zone périphérique non laminaire de la rétine des primates a permis d'identifier des photorécepteurs possédant différentes morphologies caractéristiques de l'avancée de leur différenciation suggérant la présence de cellules souches et/ou de progéniteurs dans cette région (Martínez-Navarrete et al., 2008). De plus, cette étude a également montré la présence de cellules exprimant différents marqueurs de progéniteurs rétiniens localisées dans le pars plana du corps ciliaire ainsi que dans la zone marginale à la périphérie de la rétine de primates mais aussi chez l'humain (Figure 8)(Martínez-Navarrete et al., 2008). Une autre donnée essentielle qui suggère l'existence d'une ZMC chez les mammifères a été apportée grâce à l'observation de cellules progénitrices persistantes dans la rétine de souris hétérozygotes pour le récepteur de la voie Hedgehog plusieurs mois après la naissance (Moshiri & Reh, 2004). Cette activation constitutive de la voie Hedgehog permet donc de révéler une zone de prolifération transitoire à la périphérie de la rétine ressemblant fortement à une ZMC.

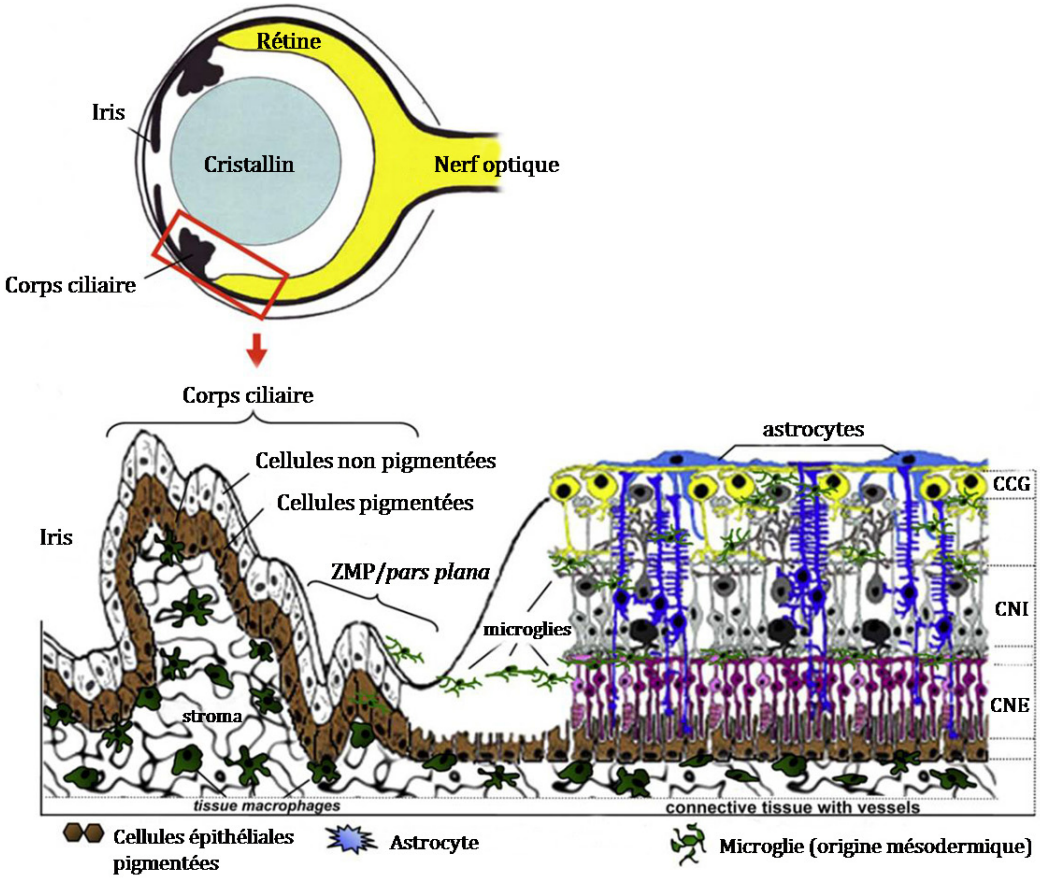


Figure 9: Le corps ciliaire dans l'œil de souris adulte. (**En haut**) Schéma d'une coupe transversale d'un œil adulte de rongeur indiquant la localisation du corps ciliaire (en rouge). (**En bas**) Structure du corps ciliaire et de la rétine neurale. D'après (Wohl, Schmeer, & Isenmann, 2012).

L'ensemble de ces données, bien qu'encore controversées, suggèrent donc qu'une population de cellules souches est bien présente au sein de la rétine périphérique des mammifères, y compris chez l'homme. Ces différentes études réalisées chez plusieurs espèces semblent indiquer que l'activité de la ZMC s'est progressivement réduite au cours de l'évolution (Perron & Harris, 2000)(Kubota et al., 2002).

2.1 Le corps ciliaire des mammifères

Le corps ciliaire de la rétine des mammifères, situé entre l'iris et la rétine neurale, semble être une autre région pouvant contenir une population de cellules souches rétiniennes (Figure 9). En 2000, deux équipes indépendantes ont démontré la présence de cellules, dans la partie pigmentée du corps ciliaire, capables de proliférer *in vitro* et de générer des neurosphères primaires et secondaires, montrant leur capacité d'auto-renouvellement (Ahmad et al., 2000)(Tropepe, 2000). En culture, ces cellules expriment des gènes tels que la *Nestine*, *Chx10*, *Rx* ou encore *Pax6* correspondant à un état de cellules neurales "immatures". Après plusieurs jours de culture et en condition de différenciation, elles expriment des marqueurs de neurones rétiniens ainsi que des marqueurs de cellules gliales de Müller, preuve de leur caractère multipotent (Tropepe, 2000)(Das et al., 2005)(Lord-Grignon et al., 2006)(Ahmad et al., 2004). En plus des neurones rétiniens, ces cellules sont aussi capables de générer des cellules de l'EPR (Aruta et al., 2011)(Vossmerbaeumer et al., 2008) et peuvent produire *in vitro* des photorécepteurs fonctionnels après manipulation génétique (Akagi et al., 2004)(Haruta et al., 2001)(Del Debbio et al., 2013)(Demontis et al., 2012). Malgré les capacités de ces cellules *in vitro*, leur identité de cellules souches est controversée. Récemment, une équipe a montré que les neurosphères obtenues après la mise en culture de l'épithélium ciliaire correspondaient à des cellules épithéliales pigmentées capable de se reprogrammer *in vitro* plutôt qu'à de véritables cellules souches (Cicero et al., 2009). En effet, toutes les cellules obtenues possèdent des caractéristiques moléculaires, cellulaires et morphologiques de cellules épithéliales différenciées. Une deuxième étude a également apporté des arguments contre l'identité souche de ces cellules. Bien qu'elles perdent leur pigmentation en culture, qu'elles prolifèrent activement et qu'elles expriment différents marqueurs de progéniteurs, elles continuent également d'exprimer les marqueurs de différenciation spécifiques de l'épithélium ciliaire

pigmenté (Gualdoni et al., 2010). De plus, leur différenciation en neurones rétiniens ne se fait pas de façon complète puisque ces cellules n'acquièrent jamais une morphologie caractéristique des cellules neurales (Gualdoni et al., 2010). L'identité de ces cellules n'est donc pas encore complètement déterminée. Plus récemment, des travaux ont réussi à mieux caractériser ces cellules permettant ainsi de les isoler en fonction de plusieurs critères: leur taille, leur pigmentation, leur faible expression de la *P-cadhérine* et au contraire leur forte expression du gène *Pax6* (Ballios et al., 2012)(Demontis et al., 2012)(Tomoyuki Inoue, 2010). L'enrichissement des cultures basées sur ces critères permet ainsi d'augmenter l'efficacité des cellules à former des neurosphères (Demontis et al., 2012). De plus, ces cellules présentent également une plus grande efficacité à exprimer des marqueurs de photorécepteurs mâtures après addition de facteurs dans leur milieu de culture. Enfin, après une longue période de culture, les auteurs montrent que ces cellules adoptent une morphologie similaire aux cellules provenant de cultures primaires de progéniteurs de photorécepteurs (Ballios et al., 2012)(Demontis et al., 2012). L'ensemble de ces résultats montre donc que malgré l'identité controversée de ces cellules, elles possèdent des propriétés similaires aux cellules souches *in vitro,* apportant ainsi un espoir important dans le développement de stratégies pouvant initier les processus de régénération dans la rétine des mammifères.

2.2 Les autres sources de cellules souches dans l'œil des mammifères

Les cellules de l'iris

Chez les rongeurs, d'autres sources de cellules souches potentielles ont été identifiées au sein de l'iris. Les cellules épithéliales de l'iris des amphibiens (Eguchi 1986), des oiseaux (Sun et al., 2006) mais aussi des rongeurs (Asami et al., 2007)(Haruta et al., 2001) ont été montrées comme possédant des caractéristiques de cellules souches en culture. Chez la souris et le rat, l'isolation de cellules de l'iris, quelques jours après la naissance ou même chez l'adulte, permet d'obtenir des cellules multipotentes présentant toutes les caractéristiques des cellules souches (Asami et al., 2007). Plus récemment, une étude a confirmé ces données en montrant que les cellules pigmentées de l'iris chez le porc étaient capables de former des neurosphères, d'exprimer des marqueurs de progéniteurs et pouvaient se différencier en neurones et cellules gliales (MacNeil et al., 2007).

De plus, comme les cellules du corps ciliaire, la manipulation génétique de ces cellules permet d'activer leur différenciation en photorécepteurs (Akagi 2005). Les cellules de l'iris sont donc une source intéressante de cellules progénitrices facilement accessibles par des techniques chirurgicales peu invasives.

Les cellules de Müller

La deuxième source de cellules souches potentielles sont les cellules de Müller. Ces cellules sont les principales cellules gliales de la rétine des vertébrés. Elles ne possèdent pas de rôle dans la transmission du signal visuel mais du fait de leur disposition radiale, de part et d'autre de la rétine neurale, elles jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie rétinienne. Elles semblent également posséder des propriétés neurogéniques bien qu'elles restent dormantes chez les individus sains (Das et al., 2006). En réponse à une lésion, les cellules de Müller des rongeurs sont capables de s'activer, proliférer et générer des précurseurs rétiniens (Dyer & Cepko 2000)(Mike O Karl et al., 2008)(Ooto et al., 2004). Les caractéristiques de ces cellules seront donc décrites plus en détails dans la partie "régénération" de ce chapitre (partie 2.5). Une sous-population de cellules de Müller possédant des caractéristiques de cellules souches a également été identifiée dans la rétine humaine (Lawrence et al., 2007)(Limb & Lawrence 2005).

3) Caractérisation moléculaire et cellulaire des cellules souches de la rétine adulte

3.1 Les marqueurs des cellules souches de la ZMC

La première difficulté majeure dans l'identification des cellules souches est le manque de marqueurs spécifiques de cette population cellulaire. L'obtention d'un nombre suffisant de gènes spécifiquement exprimés dans les cellules souches rétiniennes pourraient permettre de les identifier *in vivo* et de les différencier facilement au sein d'une population hétérogène de cellules en prolifération. Pour cela, la ZMC des poissons et des amphibiens est un excellent outil puisque la population de cellules souches est confinée à la périphérie de la ZMC (Figure 7). Les premiers marqueurs décrits comme étant spécifiquement exprimés dans les cellules souches de la rétine chez le xénope sont les composants de la voie de signalisation Hedgehog: *Gli2*, *Gli3* et *Smoothened* (Perron et al. 2003). Le gène *Gli3* présente le même patron d'expression dans la rétine post-embryonnaire chez le poulet (Moshiri et al., 2005). Le ligand ainsi que des effecteurs

Table 1 List of the 18 Retinal Stem Cell Markers Retrieved from the Screen

	Clone id	Gene Sequence Ref	Gene Symbol	Gene Description
A	RY0BAD1DH05	XM_002943439.1	*alpl*	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
B	RY0BAD1AB03	NM_001005661.1	*sulf2*	sulfatase 2
C	RY0BAD2BB02	XM_002939535.1	*spry4*	sprouty homolog 4-like
D	RY0BAD1BG08	XM_002932809.1	*gxylt1*	glucoside xylosyltransferase 1 transcript variant 2
E	RY0BAD1BH11	NM_001008078.2	*mgrn1*	mahogunin, ring finger 1
F	EC2CAA19CH04	NM_203539.1	*hes4*	hairy and enhancer of split 4
G	EC2CAA2AA11	NM_203967.1	*nop58*	NOP58 ribonucleoprotein homolog
H	RY0BAD1AH11	XR_098072.1	*LOC100127707*	partial miscRNA
I	EC2CAA2AH01	NM_203689.1	*randp1*	RAN binding protein 1
J	RY0BAD2CF11	XM_002940151.1	*kpnb1*	karyopherin (importin) beta 1
K	EC2CAA2AG04	NM_001016570.2	*aurka*	aurora kinase A
L	RY0BAD2CE12	NM_203859.1	*ncapg*	non-SMC condensin I complex, subunit G
M	RY0BND2CE04	NM_001045766.1	*zmcm3*	zygotic DNA replication licensing factor mcm3
N	RY0BAD2AG02	NM_001008082.1	*mcmbp*	minichromosome maintenance complex binding protein
O	EC2CAA2AD03	NM_001079190	*ssbp1*	single-stranded DNA binding protein 1
P	RY0BAD2CE03	NM_001126979.1	*trmt2a*	TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog A
Q	RY0BAD2DA01	NM_001102684.1	*dnajc27*	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27
R	RY0BAD1BA07	XM_002931571.1	*fndc3b*	Fibronectin type III domain-containing protein 3B-like

Figure 10: Tableau récapitulatif des 18 marqueurs de cellules souches rétiniennes identifiés chez le xénope. L'ensemble de ces gènes présente une expression restreinte à la périphérie de la ZMC. D'après (Parain et al., 2012).

de la voie de signalisation Notch, comme *Her6,* (l'orthologue de *Hes1* chez les mammifères) s'expriment aussi dans la région la plus périphérique de la ZMC chez le poisson (Raymond et al., 2006). Cette situation n'est pas identique chez le xénope puisque les composants de la voie Notch, comme *Notch* et *Delta* sont exprimés plus centralement au sein de la ZMC (Perron et al., 1998). Plus récemment, les homologues des gènes *Hes1* et *Hes4* chez le xénope ont été décrits comme des marqueurs spécifiques des cellules souches rétiniennes (El Yakoubi et al., 2012). Afin d'obtenir un nombre significatif de marqueurs de cellules souches, mon équipe d'accueil à utilisé la rétine du xénope dans le but de réaliser un crible à grande échelle auquel j'ai pu participer (Parain et al., 2012) (voir annexes). Ce travail consiste à cribler une banque d'ADNc, extraits de têtes entières et de rétines embryonnaires, par hybridation *in situ* en sélectionnant uniquement les gènes exprimés dans la première zone de la ZMC. Ce projet a permis d'identifier 18 marqueurs de cellules souches possédant une expression restreinte à la périphérie de la ZMC (Figure 10). De façon intéressante, le gène *Hes4* a été retrouvé parmi les gènes identifiés. Les autres marqueurs codent principalement pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, du métabolisme, ou encore de la transduction de signaux (Parain et al., 2012). La ZMC du poisson a également été utilisée dans des cribles génétiques ayant pour but d'identifier des mutants chez lesquels la maintenance des cellules souches de la rétine post-embryonnaire est affectée (Wehman et al., 2005). Cette étude a permis d'identifier 18 mutants ne présentant aucun défaut durant le développement embryonnaire mais incapable d'assurer la croissance de la rétine post-embryonnaire. Bien que plusieurs gènes soient connus dans la littérature pour jouer à la fois un rôle dans la régulation des cellules souches embryonnaire et post-embryonnaire (Casarosa et al., 2005), ce résultat suggère qu'il existe aussi une régulation spécifique de ces cellules durant le développement post-embryonnaire (Wehman et al., 2005).

3.2 Propriétés des cellules souches de la rétine post-embryonnaire

Le contrôle de la balance prolifération/différenciation des cellules souches rétiniennes ayant une activité proliférative constante comme celles des poissons ou des amphibiens est essentiel à l'homéostasie du tissu durant le développement post-embryonnaire. Pour cela, le contrôle de la cinétique du cycle cellulaire de ces cellules est un élément clé. Ces dernières années, quelques travaux ont commencé à décrire les caractéristiques particulières du cycle cellulaire des cellules

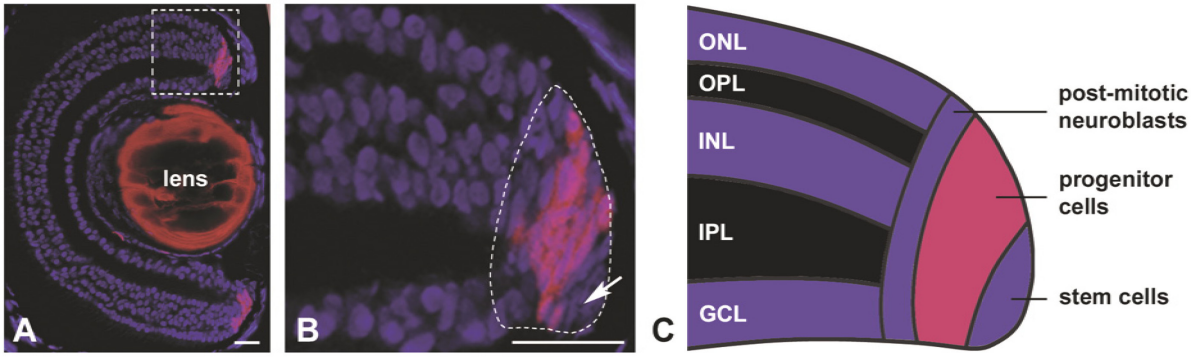


Figure 11: Propriétés des cellules souches de la ZMC. (**A**) Coupe transversale de rétine de têtard au stade 45 sur laquelle un marquage EdU a été réalisé (en rouge) après une incorporation de 5h. Les noyaux sont marqués au Hoechst (en bleu). Un marquage non-spécifique est observé au niveau du cristallin. (**B**) Agrandissement de la zone délimitée en A montrant la ZMC. Les cellules souches localisées dans la région la plus périphérique de la ZMC restent EdU(-) en raison de leur cycle cellulaire plus lent (flèche blanche). (**C**) Représentation schématique de la ZMC montrée en B. D'après (Hidalgo et al. 2014).

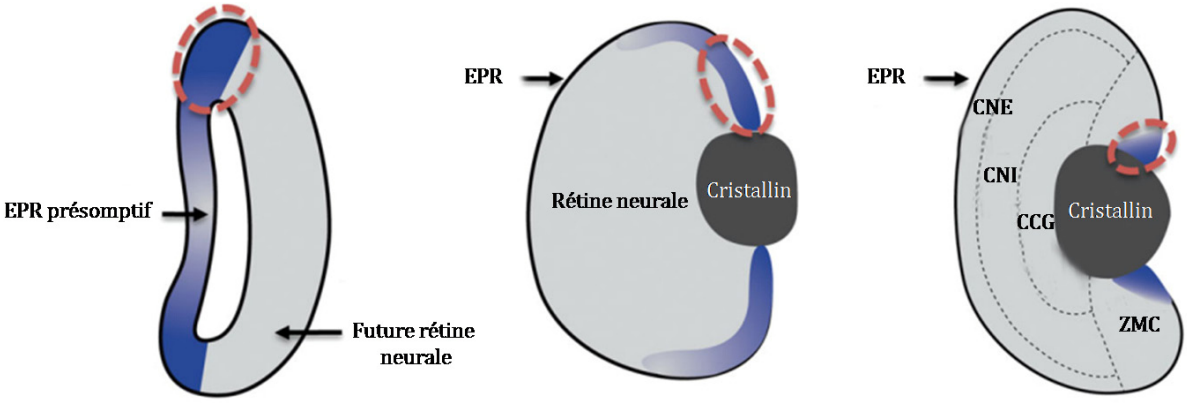


Figure 12: Modèle de l'ontogenèse des cellules souches de la ZMC chez le xénope. Modèle hypothétique de l'origine des cellules souches de la rétine post-embryonnaire chez le xénope. Ce schéma retrace l'expression dynamique du gène *Hes4* au cours de la rétinogenèse. Ce gène présente une expression bien particulière dans la région dorsale de la vésicule optique localisée à la frontière entre la future rétine neurale et l'EPR présomptif (délimitée en rouge). Ce résultat suggère que les cellules souches de la ZMC proviennent d'une population de cellules située dans cette zone au stade vésicule optique. D'après (El Yakoubi et al., 2012).

souches de la rétine chez le xénope ainsi que les différents facteurs impliqués dans leur régulation. Des expériences d'incorporation d'EdU, un analogue de la thymidine capable de s'incorporer durant la phase S du cycle cellulaire, montrent qu'une partie des cellules souches de la rétine possèdent un cycle cellulaire plus long que celui des progéniteurs (Xue & Harris, 2012). En effet, ces cellules se caractérisent par une absence de marquage au sein de la ZMC après un court pulse d'EdU (Figure 11). De la même façon, mon équipe a montré que les cellules situées dans la région charnière entre l'EPR présomptif et la rétine neurale de la vésicule optique, décrite comme contenant les futures cellules souches de la ZMC, possèdent un cycle cellulaire d'une longueur plus importante que les cellules progénitrices avoisinantes (Figure 12)(El Yakoubi et al., 2012). Les cellules de cette région de la vésicule optique expriment un certain nombre de marqueurs exprimés plus tard à l'extrême périphérie de la ZMC. Parmi ces gènes, *hes4* semble être un régulateur essentiel du cycle cellulaire, nécessaire pour maintenir les cellules souches en prolifération lente. Les mécanismes impliqués dans cette régulation du cycle cellulaire ne sont pas encore connus mais cet allongement du cycle semble être essentiellement dû à une augmentation de la longueur de la phases G1 (El Yakoubi et al., 2012).

4) Les mécanismes impliqués dans la maintenance et la prolifération des cellules souches rétiniennes adultes

L'identification des différentes sources de cellules souches dans l'œil des vertébrés a suscité de nombreuses recherches dans le but de décrire la signature moléculaire de ces cellules, la composition de leur niche biologique ainsi que les signaux moléculaires responsables de leur maintenance et de leur activité. Comme décrit précédemment, la ZMC des amphibiens et des poissons est un excellent modèle dans le but d'étudier *in vivo* les mécanismes qui contrôlent la prolifération et la maintenance de ces cellules. Dans ces modèles, plusieurs études suggèrent que les voies de signalisation clés comme les voies Wnt, Hedgehog ou encore la voie Notch pourraient être impliquées dans la régulation de l'activité des cellules souches de la rétine post-embryonnaire (Toshihiro Inoue et al., 2006)(Bhattacharya et al. 2007).

4.1 Les facteurs de croissance

Plusieurs études suggèrent que l'activité proliférative inexistante des cellules souches et progénitrices de la rétine des mammifères pourrait être en partie due à un manque de

facteurs dans leur environnement. Ainsi, des chercheurs ont émis l'hypothèse que l'addition de facteurs de croissance extracellulaires pourrait augmenter la prolifération de ces cellules dans la rétine des mammifères ou des oiseaux. Dans la ZMC du poussin, une injection intra-oculaire d'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) ou d'EGF (Epidermal Growth Factor) augmente la prolifération des progéniteurs (Fischer & Reh, 2000). Les effets stimulants de l'IGF sur la prolifération ont également été observés chez les poissons (Hitchcock, 1998)(Otteson & Hitchcock, 2003). Les progéniteurs de la ZMC chez les oiseaux ont une capacité de différenciation beaucoup plus limitée puisqu'ils ne peuvent pas donner de cellules ganglionnaires ou de photorécepteurs (Fischer & Reh, 2000). Dans ce contexte, l'application combinée de FGF2 et d'insuline peut induire une différenciation en cellules ganglionnaires (Fischer, Dierks, & Reh, 2002). Ce résultat suggère qu'en plus de la prolifération, la capacité de différenciation de ces progéniteurs peut être modulée par l'application de différents facteurs de croissance exogènes. La double injection intraoculaire d'IGF1 et d'insuline induit aussi la prolifération des cellules de l'épithélium ciliaire des mammifères *in vivo* (Das et al., 2004)(X. Zhao et al., 2005)(Abdouh & Bernier, 2006). Cette stimulation entraîne une nouvelle acquisition des caractéristiques embryonnaires comme l'expression de la *Nestine* et des marqueurs de prolifération comme la *cycline D1* et *Ki67* dans une petite population de cellules épithéliales (Abdouh & Bernier, 2006). Dans cette étude, l'effet sur la prolifération cellulaire par les facteurs de croissance se fait de façon dose dépendante mais aucune migration ni différenciation de ces cellules n'a été observée.

4.2 La voie de signalisation Hedgehog

La voie de signalisation Hedgehog, bien connue pour jouer un rôle essentiel dans le développement neural, a été identifiée dans plusieurs études comme étant impliquée dans le contrôle de la prolifération des cellules souches et des progéniteurs rétiniens. En effet, l'activation de la voie par injection d'ARNm *Shh* (*Sonic Hedgehog*) durant les premiers stades du développement embryonnaire chez le xénope stimule la prolifération des cellules de la ZMC (Locker et al., 2006). Au contraire, l'application de cyclopamine, un agent pharmacologique inhibiteur de la voie Hedgehog, durant le développement embryonnaire précoce provoque des effets opposés sur la prolifération des cellules souches et des progéniteurs rétiniens (Locker et al., 2006). De la même façon, des injections intra-oculaires de la protéine Shh augmentent la prolifération de la ZMC chez le poussin (Moshiri et al., 2005). Un rôle similaire de la voie de

signalisation Hedgehog *in vivo* a également été montré chez les mammifères puisque comme décrit précédemment, les souris hétérozygotes pour le récepteur de la voie, *Ptc (Patched)*, dans lesquelles la voie Hedgehog est constitutivement active, montrent une persistance des progéniteurs dans la région périphérique de la rétine jusqu'à plusieurs mois après la naissance (Moshiri & Reh, 2004).

4.3 La voie de signalisation Wnt

La voie Wnt est une cascade de signalisation impliquée dans le contrôle d'une grande quantité de processus développementaux. Plus récemment, son rôle dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation des cellules souches de différents tissus a été particulièrement étudié. Concernant l'œil, la voie de signalisation Wnt est active à la périphérie de la rétine, incluant la ZMC chez plusieurs espèces. Par exemple, l'utilisation de souris transgéniques rapportrices de l'activité Wnt, montre une expression du gène rapporteur à la périphérie de la rétine (Hong Liu et al. 2003). Un résultat similaire a également été observé chez le poisson (Dorsky, Sheldahl, & Moon, 2002) et le poulet (Cho & Cepko, 2006). Parmi les gènes Wnt exprimés dans la rétine, Wnt2b semble être un candidat intéressant dans le contrôle de l'activité des cellules souches et des progéniteurs rétiniens. Chez la souris et le poulet, *Wnt2b* présente un patron d'expression très similaire à celui de l'expression de la construction rapportrice de l'activité Wnt (Hong Liu et al., 2003). De plus, la surexpression de *Wnt2b* inhibe la différenciation neuronale et maintient l'état indifférencié des progéniteurs rétiniens. Au contraire, la perte de fonction de *Wnt2b* inhibe la prolifération cellulaire de la ZMC et entraîne une différenciation neuronale prématurée (Kubo, 2003)(Kubo, Takeichi, & Nakagawa, 2005). *Wnt3a* a aussi été montré comme un régulateur capable d'augmenter la prolifération des cellules du corps ciliaire de mammifères *in vitro* (Toshihiro Inoue et al., 2006). De plus, la surexpression de *Wnt3a* dans ces cellules en culture augmente le nombre de cellules dans les neurosphères primaires mais aussi dans les neurosphères secondaires. L'activation de la voie Wnt régule donc positivement la prolifération et l'auto-renouvellement des cellules souches *in vitro* (Toshihiro Inoue et al., 2006).

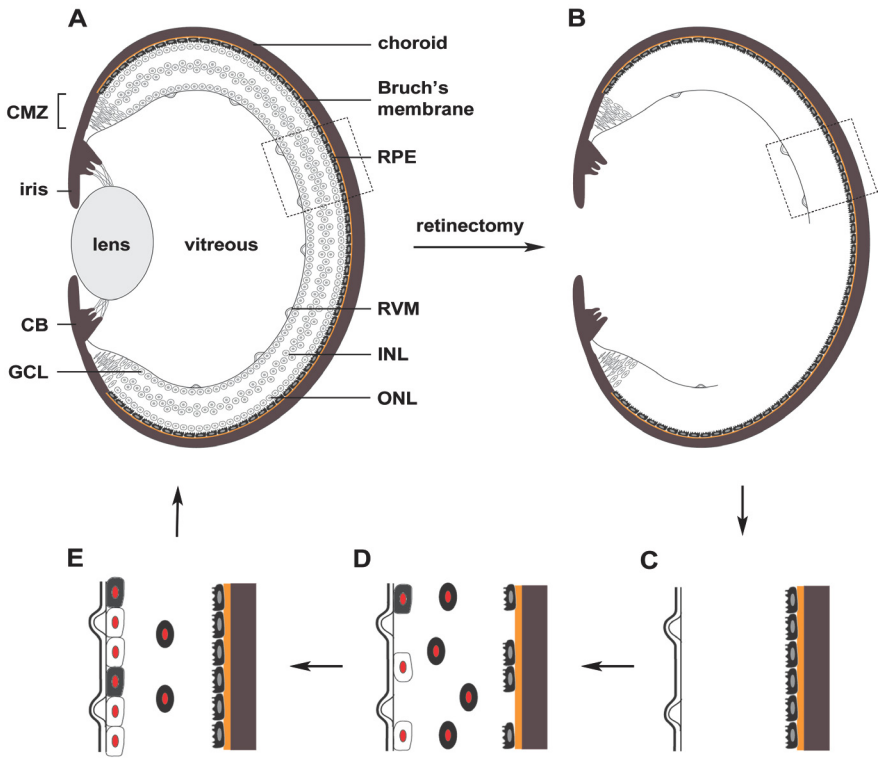


Figure 13: Régénération de la rétine via la trans-différenciation de l'EPR chez le xénope. Après une ablation partielle de la rétine (**B-C**), une sous-population de cellules de l'EPR se détache de la membrane de Bruch, exprime le facteur *Pax6* (en rouge) et migre afin de former un nouvel épithélium (**D**). Les cellules de l'EPR fixées à la membrane vasculaire prolifèrent et se trans-différencient en précurseurs neuraux. La prolifération de ces cellules permet la régénération entière de la rétine et les cellules toujours attachées à la membrane de Bruch reforment un épithélium pigmenté (**E**). D'après (Hidalgo et al. 2014).

4.4 La voie de signalisation Notch

La voie de signalisation Notch a principalement été étudiée au cours du développement embryonnaire, mais quelques travaux semblent indiquer que cette voie est également impliquée dans la régulation des cellules souches et des progéniteurs de la rétine adulte. La mise en culture de cellules de l'épithélium ciliaire provenant de souris transgéniques, dans lesquelles l'activité de la voie Notch est inhibée, forme beaucoup moins de neurosphères par rapport au culture de cellules épithéliales sauvages (Alexson et al. 2006).

5) Les processus de régénération dans la rétine

5.1 Chez les amphibiens

La régénération de la rétine est une problématique très étudiée depuis de nombreuses années chez une grande variété d'espèces d'animales, en particulier chez les amphibiens qui possèdent des capacités de régénération exceptionnelles (Hidalgo et al. 2014)(Del Rio-Tsonis & Tsonis, 2003). Les amphibiens urodèles ont été les premiers organismes modèles utilisés dans ce domaine. Les tritons ou les salamandres possèdent la capacité de régénérer leur rétine après une ablation totale, y compris chez l'adulte (Mitashov, 1997)(Del Rio-Tsonis & Tsonis, 2003)(Fort & Araki, 2007). Plus tard, le xénope, déjà très étudié en biologie du développement, devient également un modèle de choix dans l'étude des processus de régénération bien que ses capacités ne soient pas aussi importantes que celles des urodèles. Chez le têtard, la rétine est capable de régénérer après une ablation chirurgical des 2/3 de l'œil (Ide et al. 1984)(Ide et al., 1987). Cependant, il avait été montré que ce potentiel tendait à disparaître après l'étape de métamorphose (Hitchcock et al., 2004). Cette notion a été remise en question quelques années plus tard par une équipe japonaise en montrant que la rétine neurale d'un xénope mâture âgé de 3 à 9 mois après la métamorphose était capable de régénérer après une ablation chirurgicale différente (Yoshii et al., 2007). Une question majeure des recherches sur cette problématique a donc été d'identifier les différentes sources de cellules à l'origine de cette régénération. La majeur partie de la rétine nouvellement formée semble provenir des cellules de l'EPR chez le xénope comme chez les urodèles (Yoshii et al., 2007)(Fort & Araki, 2007)(Henry et al. 2008). Ce processus de régénération est possible grâce à la trans-différenciation d'une sous-population de cellules de l'EPR qui aboutît à une entrée de ces cellules

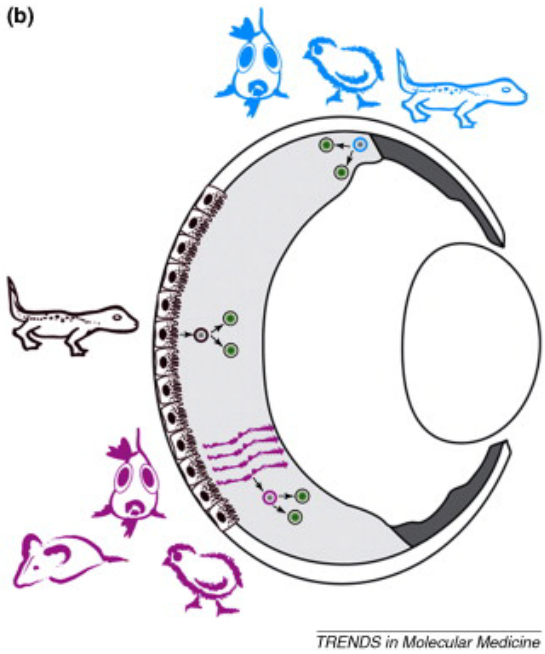


Figure 14: Les principales sources cellulaires à l'origine de la régénération de la rétine chez différentes espèces. Selon les espèces, il exite trois sources principales de cellules pouvant participer à la régénération de la rétine en cas de lésion: les cellules de Müller, les cellules de l'EPR et les cellules de la ZMC. D'après (M O Karl & Reh, 2010).

dans le cycle cellulaire, une perte de leur pigmentation et la formation d'une nouvelle couche cellulaire (Figure 13)(Araki, 2007)(Reh, 1991). Les cellules de cette nouvelle couche continuent de proliférer et peuvent générer une rétine complète possédant une structure et une lamination correcte. Plus récemment, des études ont réussi à reformer la structure d'une rétine *in vitro* en utilisant du tissu de l'EPR chez le xénope (Kuriyama et al., 2009)(Nabeshima et al., 2013). Malgré l'importance de ce mécanisme de trans-différenciation des cellules de l'EPR dans la régénération de la rétine chez les amphibiens, plusieurs études montrent que les cellules souches et les progéniteurs de la ZMC participent également à ces processus (Yoshii et al., 2007)(Hidalgo et al.2014)(Hitchcock et al., 2004). Des études utilisant des modèles dépourvus d'un type cellulaire rétinien donné montrent que les cellules de la ZMC sont capables d'augmenter leur différenciation en un type cellulaire afin de remplacer les neurones détruits (Negishi, Teranishi, & Kato, 1982)(Reh, 1987)(Reh & Tully, 1986). Ainsi, l'ensemble des amphibiens possède la capacité de régénérer leur rétine mais par des processus de régénération et grâce à l'utilisation de types cellulaires différents. Cette conclusion est également vraie au sein même du genre des anoures entre les différentes espèces de xénope. En effet, alors que la transdifférenciation des cellules de l'EPR semble jouer un rôle majeur chez l'espèce *Xenopus laevis*, de récents travaux réalisés chez *Xenopus tropicalis* montrent que la rétine de cette espèce régénère principalement grâce à l'activité des cellules de la ZMC (Miyake & Araki, 2014).

5.2 Chez les poissons

Les poissons ont également la capacité de produire de nouvelles cellules rétiniennes après une dégénérescence mais en utilisant des mécanismes différents de ceux décrits précédemment. Chez ces espèces, plusieurs études montrent que les cellules gliales de Müller, contrairement aux cellules de l'EPR, jouent un rôle essentiel dans les processus de régénération (Figure 14) (Bernardos et al., 2007)(Fausett & Goldman, 2006)(Raymond et al., 2006). Ainsi, contrairement aux amphibiens, les poissons ne sont pas capables de régénérer leur rétine après une ablation complète même en présence de l'EPR. Les cellules de Müller sont également connues pour garder une activité proliférative dans la rétine non lésée durant le développement post-embryonnaire (Bernardos et al., 2007). Dans ce cas, la descendance de ces cellules est exclusivement composée de bâtonnets. Cependant, en réponse à une multitude de lésions, ces cellules sont capables de produire l'ensemble des types cellulaires neuraux de la rétine en plus des bâtonnets (Bernardos et al., 2007)(Fimbel et al., 2007)(Ramachandran, Zhao, 2013)(Wu et al., 2001). Enfin, comme chez les amphibiens,

certains travaux montrent que la ZMC des poissons semble également participer aux processus de régénération. La population de cônes située à la périphérie de la rétine régénère à partir des cellules de la ZMC après une lésion provoquée par des substances neurotoxiques (Stenkamp et al., 2001).

5.3 Chez les mammifères

Bien qu'il n'existe pas de phénomène de régénération à proprement parlé chez les mammifères adultes, certaines études suggèrent qu'une "amorce" de processus régénératifs peut avoir lieu à partir des différentes sources de cellules souches potentielles décrites précédemment. Une réponse régénérative à partir des cellules de Müller existe chez les mammifères mais reste très limitée (Figure 14)(Goldman, 2014). Ces cellules se réactivent suite à une lésion et deviennent hypertrophiques (Bringmann et al., 2009). Elles jouent alors un rôle de protection et préservent les tissus en libérant des antioxydants et des facteurs neurotrophiques. L'utilisation d'agents pharmacologiques permettant de détruire les cellules ganglionnaires, bipolaires ou les photorécepteurs peut induire la prolifération d'une faible sous-population de cellules de Müller et conduire à un processus de régénération mais ces événements restent relativement rares (Ooto et al., 2004)(Wan et al., 2008). Des études réalisées *in vitro* montrent tout de même que ces cellules sont capables de générer des neurones dans des conditions de culture particulières (Das et al., 2006)(Lawrence et al., 2007)(Singhal et al., 2012). *In vivo*, la surexpression de signaux mitogènes semble augmenter la prolifération des cellules de Müller et la régénération de la rétine des mammifères après une lésion (M O Karl & Reh, 2010)(Ooto et al., 2004)(Osakada et al., 2007)(Takeda et al., 2008)(Wan et al. 2007)(Pollak et al., 2013). L'injection d'EGF semble être la méthode la plus efficace pour augmenter le nombre de cellules de Müller marquées au BrdU chez le rat adulte suite à une destruction des photorécepteurs (Close et al. 2006). Concernant la région périphérique de la rétine, des études ont observé qu'une sous population de cellules de la zone marginale des mammifères exprime des marqueurs neuronaux après une lésion (Jian et al., 2009) Ainsi, il a été montré que la destruction des cellules ganglionnaires dans la rétine de souris par ischémie conduisait à la prolifération des cellules du corps ciliaire et à l'expression de marqueurs neuronaux (Nickerson et al., 2007). Bien que l'efficacité de l'ensemble des processus de régénération retrouvés chez les mammifères est très loin de celle décrite chez les poissons et les amphibiens, ces données suggèrent quand même qu'un certain potentiel régénératif persiste chez les mammifères.

3. CONCLUSION

L'existence de populations de cellules capables de présenter des propriétés de cellules souches *in vitro* ou *in vivo* dans des contextes pathologiques en présence de facteurs exogènes chez les mammifères, y compris chez l'homme offre de réels espoirs de "régénération endogène". La caractérisation moléculaire de ces cellules représente donc un intérêt majeur dans le but de comprendre les mécanismes responsables de leur quiescence *in vivo* et de leur potentiel de réactivation. Pour cela, la ZMC des poissons et des amphibiens qui contient une population de cellules souches actives, représente un excellent modèle dans l'étude des mécanismes de régulation de ces cellules. Depuis plusieurs années, mon équipe d'accueil s'intéresse aux différentes voies de signalisation impliquées dans le maintien et la prolifération de ces cellules comme les voie Wnt et Hedgehog. Ainsi, la découverte récente d'une nouvelle voie de signalisation nommée "Hippo", impliquée dans la prolifération et la survie des cellules, a offert une nouvelle perspective de recherche dans ce domaine.

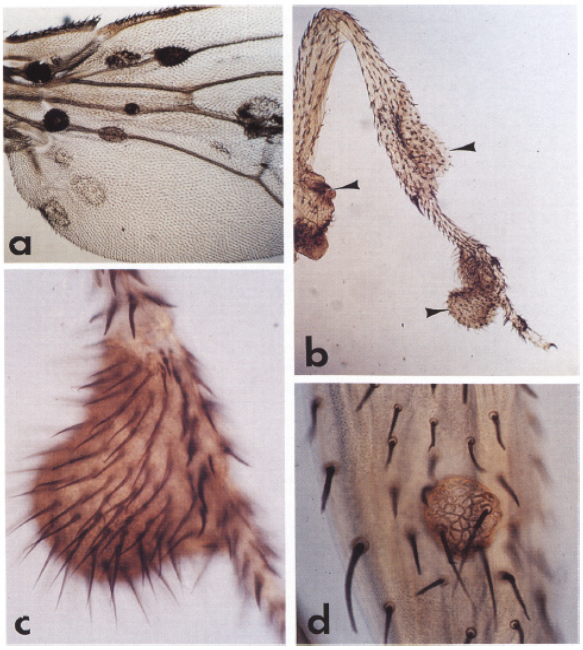


Figure 15: Phénotype des clones homozygotes mutants pour *Wts* chez la drosophile. La délétion de *Wts* dans les tissus mutants provoque la formation d'excroissances à la surface de l'ensemble du corps chez la drosophile. Les clones *Wts*$^{-/-}$ ont été obtenus par recombinaison mitotique. (**a**) Clones obtenus au niveau de l'aile (**b**) et de la patte. (**c**) Agrandissement du tissu mutant au niveau de la patte. (**d**) Certains clones à la surface de l'épithélium de la patte montrent une forme très arrondie inhabituelle ressemblant à une verrue. D'après (Justice et al., 1995).

Figure 16: Phénotypes mutants des différents membres de la voie Hippo. En comparaison avec une mouche contrôle (**a**), les têtes des mouches chez lesquelles une partie du tissu de la tête et des yeux est hétérozygote mutant pour le gène (**b**) *Hpo*, (**c**) *Wts* et (**d**) *Sav* présentent une taille surdimensionnée. Les cellules mutantes sont générées par une technique de mosaïcisme qui induit la mort des cellules normales par la présence d'une mutation létale (+/+). Cette technique permet de marquer les cellules mutées en blanc alors que les cellules hétérozygotes ont une couleur orangée. On remarque ainsi que chez les yeux des mutants *Hpo*, *Wts* et *Sav* sont presque exclusivement composés de cellules homozygotes mutantes (95%) alors que les yeux des mouches contrôles possèdent environs 50% de cellules hétérozygotes. D'après (Madhuri Kango-Singh & Singh, 2009).

CHAPITRE II : LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO

1. LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO

1) Découverte de la voie Hippo chez la drosophile

Dans les années 1990, les principaux composants de la voie de signalisation Hippo ont été découverts chez la drosophile par la réalisation de cribles génétiques visant à identifier de nouveaux gènes « suppresseurs de tumeurs » responsable de la régulation de la croissance sans modification du « patterning » des organes. Ainsi, le premier composant de la voie identifié fut la protéine kinase de la famille NDR (Nuclear Dbf2-Related) **WTS** (*Warts*) (Justice et al., 1995)(Xu et al., 1995). L'induction de tissus mosaïques composés de cellules mutantes pour le gène *Wts* montrent que ces cellules grossissent anormalement et forment chez l'adulte des sortes de verrues ("warts" en anglais)(Figure 15). Malgré l'effet drastique du phénotype obtenu en perte de fonction, *Wts* ne semble pas affecter l'organisation tissulaire. C'est seulement en 2002 que le second composant de la voie, une protéine de soutien, **SAV** *(Salvador),* fut identifié (Tapon et al., 2002)(M. Kango-Singh, 2002). La perte de fonction de *Sav* induit un phénotype similaire à celui observé chez le mutant *Wts*. La réalisation d'autres cribles utilisant la même stratégie a ensuite permis d'identifier la kinase **HPO** (*Hippo*) qui appartient à la famille des Sterile 20-like kinases (Harvey, Pfleger, & Hariharan, 2003)(Wu et al., 2003)(Udan et al., 2003)(Pantalacci, Tapon, & Léopold, 2003)(Jia et al., 2003) ainsi que la protéine adaptatrice **MATS** (Mobs-As-Tumor-Supressor)(Lai et al., 2005)(Harvey & Tapon, 2007). Ainsi, contrairement aux voies de signalisation bien connues en biologie du développement comme les voies Wnt, Hedgehog, Notch ou FGF, nommées en fonction de leur ligand ou de leur récepteur, la voie Hippo porte le nom d'une kinase qui transduit le signal intracellulaire. Le nom "Hippo", faisant référence aux hippopotames, récapitule bien l'ensemble des phénotypes d'excès de croissance obtenus après une perte de fonction de ces différents composants (Figure 16). Les quatre facteurs constituant le noyau central de la voie de signalisation Hippo sont alors découverts et la ressemblance des phénotypes obtenus lors de la perte de fonction de ces gènes conduisent les chercheurs à l'idée que ces gènes pourraient faire partie d'une même voie de signalisation.

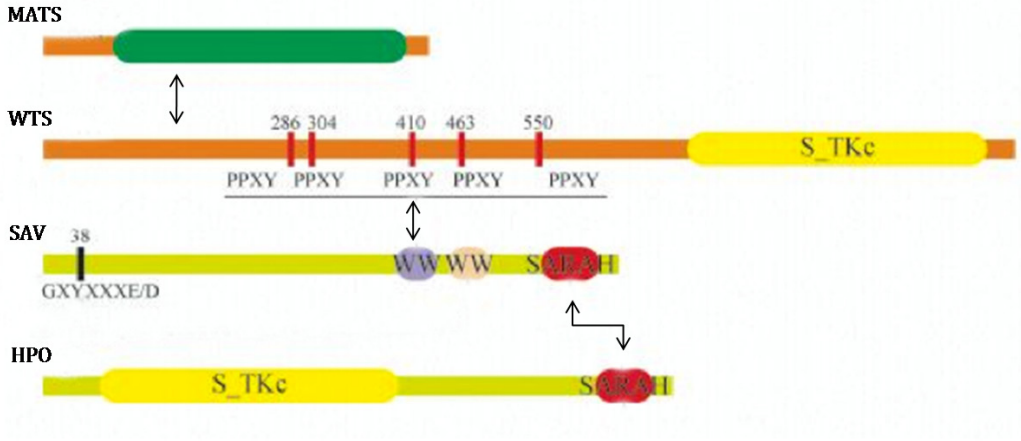


Figure 17: Schéma représentatif des interactions clés entre les composants du cœur de la voie Hippo. Les abréviations utilisées sont S_TKc: domaine sérine/thréonine kinase; SARAH: Sav/Rassf1/Hippo; WW: domaine contenant deux résidus tryptophane conservés. D'après (Chen, Loh, & Song, 2010).

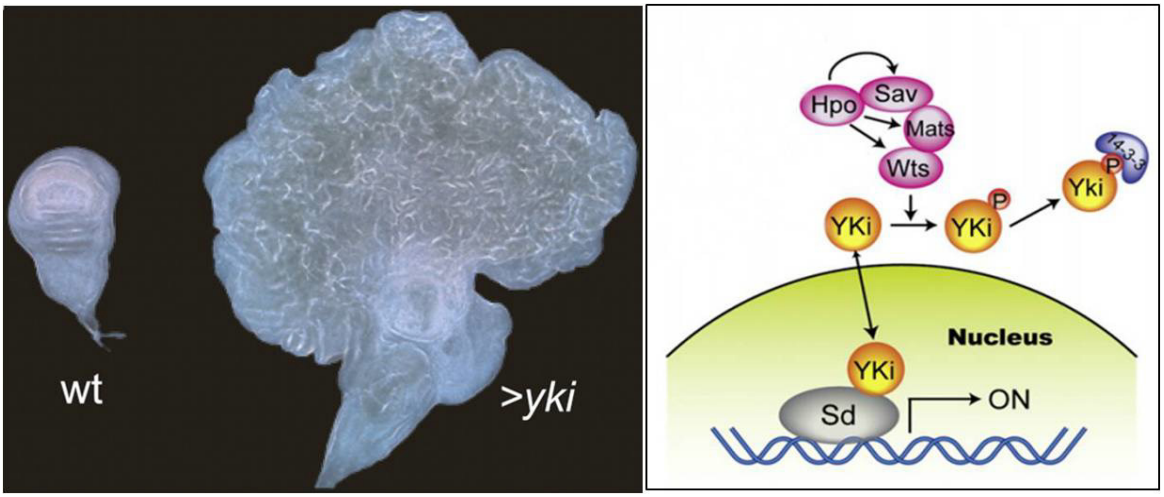


Figure 18: La surexpression de *Yki* provoque un phénotype d'excès de croissance dans les disques imaginaux d'aile chez la drosophile. (**A gauche**) Comparaison d'un disque imaginal d'aile de drosophile sauvage (à gauche) à un disque imaginal chez lequel le gène *Yki* a été surexprimé (à droite). D'après (Pan, 2010a). (**A droite**) Schéma simplifié du cœur de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile. Adapté de (Zhao, Lei, & Guan, 2009).

Plus tard, des études biochimiques ont ensuite confirmé que ces quatre suppresseurs de tumeurs appartiennent bien à une même cascade de kinases dans laquelle le complexe HPO-SAV phosphoryle et active le deuxième complexe formé des protéines WTS et MATS (Wu et al., 2003)(Wei, Shimizu, & Lai, 2007). Les protéines adaptatrices SAV et MATS régulent l'activité de la cascade centrale de la voie Hippo. SAV interagit directement avec HPO via son domaine C-terminal appelé SARAH domain (Sav/RASSF/Hpo) et peut également lier la protéine WTS en se fixant à son motif riche en résidus proline (PPXY) via son domaine WW (Figure 17)(Wu et al., 2003)(Udan et al., 2003)(Pantalacci et al., 2003)(Jia et al., 2003)(Harvey et al., 2003)(Scheel & Hofmann, 2003). SAV, également phosphorylé par Hpo, permet de potentialiser la phosphorylation de WTS par HPO lors de l'activation de la cascade (Wu et al., 2003)(Pantalacci et al., 2003). De façon similaire, MATS interagit avec WTS et potentialise son activité kinase (Lai et al., 2005).

En 2005, le co-activateur transcriptionnel **YKI** (*Yorkie*) fut ajouté aux membres des composants de la voie grâce à des expériences de double hybride utilisant la protéine WTS comme appât (Huang et al., 2005). Des études génétiques ont ensuite montré que *Yki* se situait en aval de la cascade de kinases et des analyses biochimiques ont mis en évidence que WTS phosphoryle et inactive directement YKI (Huang et al., 2005)(Dong et al., 2007). En effet, l'activation de la cascade de kinases aboutit à la phosphorylation et à l'inhibition des activités nucléaires de l'effecteur de la voie, YKI. Ainsi, la surexpression de *Yki* phenocopie la perte de fonction des différents composants de la cascade de kinases (Figure 18). La phosphorylation de ce dernier sur son résidu 168 permet la fixation des protéines 14-3-3 aboutissant à la séquestration de YKI dans le cytoplasme. Au contraire, lorsque la cascade de kinase est inactive, YKI n'est pas phosphorylé et peut alors transloquer dans le noyau où il active la transcription de différents gènes cibles (Figure 18)(Kanai et al., 2000)(Dong et al., 2007)(Zhao et al., 2007)(Lei et al., 2008)(Oh & Irvine, 2008)(Ren, Zhang, & Jiang, 2010). YKI est un co-activateur transcriptionnel, il ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN et à donc besoin de se lier à différents facteurs de transcription pour activer la transcription des gènes cibles de la voie. L'un des premiers partenaires de YKI identifié le plus connu est le facteur appartenant à la famille TEAD/TEF (TEA Domain familymember/Transcription Enhancer Factor) **SD** (*Scalloped*)(Wu et al., 2008)(Figure 18). En réalité, YKI possède également d'autres partenaires comme les protéines HTH (Homothorax), TEASHIRT et MAD (Mothers against Dpp) (Alarcón et al., 2009)(Peng, Slattery, & Mann, 2009a)(Oh, Hyangyee, 2011).

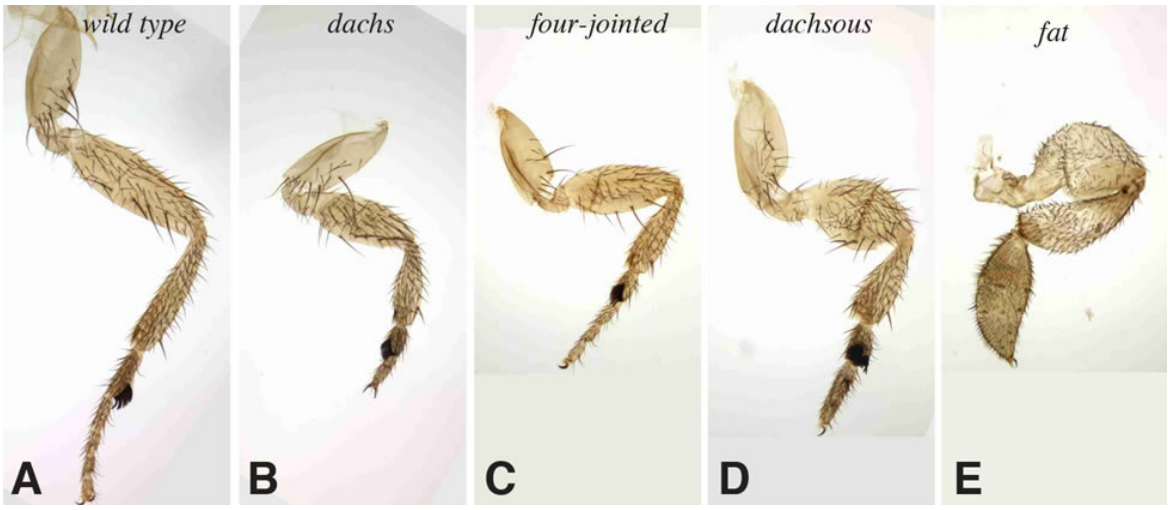


Figure 19: La signalisation *Fat-Ds* contrôle la taille et la forme des pattes chez la drosophile. Comparaison d'une patte de drosophile sauvage (**A**) à une patte de drosophile mutée pour le gène *Dachs* (**B**), le gène *Fj* (**C**), *Dachsous* (**D**) ou *Fat* (**E**). La délétion de ces gènes modifie à la fois à taille et la forme des pattes. D'après (Mao et al., 2006).

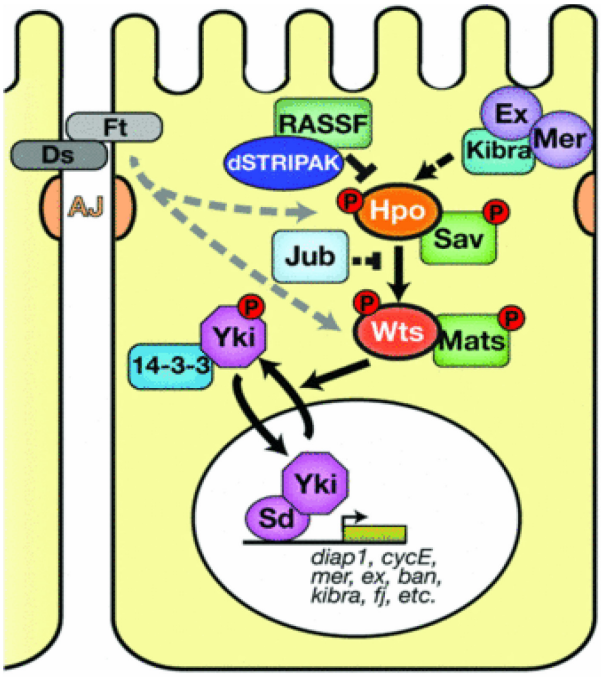


Figure 20: La voie de signalisation Hippo chez la drosophile. Représentation schématique de la voie de signalisation Hippo dans une cellule épithéliale chez la drosophile. Les lignes en pointillées représentent des interactions génétiques non démontrées. D'après (Genevet & Tapon, 2011).

Depuis 2005, la recherche sur cette nouvelle voie de signalisation ne cesse de progresser à une vitesse impressionnante. Chaque année, plus d'une vingtaine de revues sont publiées sur le sujet et des congrès internationaux sont spécifiquement dédiés à cette nouvelle voie de signalisation. Ces dernières années, la principale question a été notamment de comprendre comment ce module de signalisation intracellulaire répond-t-il aux signaux extracellulaires. De nombreuses études ont identifié les composants en amont de la cascade Hippo chez la drosophile comme les protéines à domaine FERM (Famille 4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) **MER** (*Merlin*) et **EX** (*Expanded*)(Hamaratoglu et al., 2006). Ces deux facteurs interagissent ensemble et agissent de façon redondante dans l'activation de la voie Hippo. Les protéines à domaine FERM sont connues pour jouer un rôle d'intermédiaire entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette. Ainsi, *Mer* et *Ex* pourraient être les intermédiaires reliant la cascade de kinases avec de potentiels récepteurs membranaires. Dans la littérature, la proto-cadhérine atypique **FAT** est un récepteur potentiel de la voie puisqu'elle est la première protéine transmembranaire impliquée dans la régulation de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile (Bennett & Harvey, 2006)(Tyler & Baker, 2007)(Silva et al., 2006). Le récepteur FAT agit en fixant une autre cadhérine transmembranaire appelée **DS** (*Dachsous*) (Matakatsu & Blair, 2006). Les kinases DCO (Disc Overgrown) et FJ (Four Jointed) favorisent la liaison entre FAT et DS en phosphorylant leurs domaines cadhérine (Ishikawa et al., 2008)(Feng & Irvine, 2009). Les mécanismes par lesquels le récepteur FAT ainsi que les différents facteurs en amont modulent la cascade de signalisation ne sont pas encore bien compris mais la mutation de ces gènes provoque bien un phénotype d'excès de croissance (Figure 19). Les phénotypes obtenus sont moins forts que ceux obtenus après une perte de fonction d'un des membres du cœur de la voie suggérant que ces composants agissent de manière combinée pour contrôler l'activité de la voie (Hamaratoglu et al., 2006). Plus tard, une troisième protéine a été ajoutée au complexe Ex/Mer, la protéine **KIBRA** (Yu et al., 2010). Le complexe formé par Kibra/Ex/Mer semble interagir avec la cascade de kinases Hippo par de nombreuses interactions protéine-protéine entre les domaines WW des protéines KIBRA, SAV et YKI et les domaines PPxY des protéines EX, HPO et WTS (Yu et al., 2010)(Genevet et al., 2010). Enfin, d'autres protéines ont été identifiées comme étant des régulateurs de la voie Hippo, la protéine **RASSF** et la protéine **dJUB** (Ajuba) interagissent négativement avec la kinase HPO (Polesello et al., 2006)(Das Thakur et al., 2010)(Figure 20). Etant donné le nombre de facteurs agissant en amont de la cascade de kinases, j'ai choisi de décrire l'ensemble de cette régulation dans une autre partie de ce chapitre (Partie 1.3).

Human proteins	*D. melanogaster* protein	Protein function	Domain composition
Core components			
MST1, MST2	Hpo	Serine/threonine kinase, STE20 family	Kinase domain, SARAH domain
SAV1 (also known as WW45)	Sav	Adaptor protein	FERM domain-binding motif, two WW domains, SARAH domain
LATS1, LATS2	Wts	Serine/threonine kinase, NDR family	Kinase domain
MOB1A, MOB1B	Mats	Cofactor	MOB domain
YAP, TAZ	Yki	Transcriptional co-activator	Two WW domains, 14-3-3 binding motif, TEAD-binding motif, PDZ-binding motif
TEAD1–TEAD4	Sd	Transcription factor	TEAD DNA-binding domain, vestigial binding domain
Pathway modulators			
CRB1–CRB3	Crb	Transmembrane receptor	EGF domains, four laminin AG domains, transmembrane domain
PATJ, MUPP1	Patj	Adaptor protein	Ribosomal protein L27, eight PDZ domains
MPP5 (also known as PALS1)	Sdt	Adaptor protein	Ribosomal protein L27, PDZ domain, SH3 domain, GUK domain
AMOT, AMOTL1, AMOTL2	-	Adaptor protein	Coiled coil domain, PDZ binding motif
NF2	Mer	Adaptor protein	FERM domain
KIBRA	Kibra	Adaptor protein	Two WW domains, C2 domain
FRMD6 (also known as EX1)	Ex	Adaptor protein	FERM domain
TAO1–TAO3	Tao	Serine/threonine kinase	Kinase domain
MARK1–MARK4	Par-1	Serine/threonine kinase	Kinase domain
E-cadherin	E-cadherin	Transmembrane receptor	Five cadherin domains, transmembrane domain
α-catenin	α-catenin	Adaptor protein	VH1–VH3 domains
Ajuba, LIMD1, WTIP	Jub	Adaptor protein	Three LIM domains
ZYX, LPP, TRIP6	Zyx	Adaptor protein	Three LIM domains
RASSF1–RASSF6	Rassf	Adaptor protein	RAS association domain, SARAH domain
PP2A	STRIPAK–PP2A complex (dSTRIPAK)	Phosphatase	Phosphatase domain
SCRIB	Scrib	Adaptor protein	16 LRR domains, 4 PDZ domains
LGL1, LGL2	Lgl	Adaptor protein	Four WD40 domains
DLG1–DLG4	Dlg	Adaptor protein	Three PDZ domains, SH3 domain, GUK domain
PTPN14	Pez	Phosphatase	FERM domain, phosphatase domain
CSNK1	Dco	Serine/threonine kinase	Kinase domain
β-TRCP	Slimb	SCF-type E3 ubiquitin ligase	F-box domain, β-TRCP domain, WD40 domain
HIPK	Hipk	Serine/threonine kinase	Kinase domain
MASK1, MASK2	Mask	Adaptor protein	Two ankyrin domains, KH domain
WBP2	Wbp2	Cofactor	GRAM domain
VGL4	Tgi	Cofactor	Two tondu domains

Figure 21: Les homologues des composants de la voie Hippo chez les mammifères. D'après (Johnson & Halder, 2014).

2) La voie Hippo chez les mammifères

La découverte des membres de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile a provoqué un énorme engouement pour étudier cette même voie de signalisation chez les mammifères. Bien que de nombreuses études ont démontré expérimentalement la conservation de la structure de cette voie ainsi que son rôle dans la régulation de la taille des organes chez les mammifères, elles ont également révélé une complexité plus importante. En effet, la plupart des composants de la voie possèdent un ou plusieurs homologues chez les mammifères. Il existe deux homologues d'Hpo, **MST1** et **MST2** (Mammalian Sterile 20-like kinase aussi connus sous le nom de STK3 et STK4) et deux homologues de Wts, **LATS1** et **LATS2** (Large Tumor Supressor). Des homologues chez les mammifères ont été identifiés pour l'ensemble des composants de la voie Hippo (Figure 21). De la même façon que chez la drosophile, les kinases MST et LATS forment chez les mammifères une cascade de phosphorylation aboutissant à la phosphorylation des homologues de *Yki*, **YAP** (Yes Associated Protein) et **TAZ** (Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif) (Dong et al., 2007)(Lei et al., 2008). Ainsi, les kinases MST, associées à la protéine **SAV1** (l'homologue de Salvador aussi appelé WW45) phosphoryle et active les kinases LATS associées aux co-facteurs **MOB1A** et **MOB1B** (Wu et al., 2003)(Callus et al., 2006)(Praskova, Xia, & Avruch, 2008) (Chan et al., 2005). Cette étape aboutit à la phosphorylation de YAP et TAZ sur leur résidu sérine 127 (YAP127 et TAZ89 chez la souris) et à l'inhibition de leurs activités nucléaires (Figure 22). Plus récemment, il a été montré que chez les mammifères, la phosphorylation de YAP et TAZ par les protéines LATS sur une autre sérine (Ser381) peut aussi entraîner leur dégradation par le protéasome. Cette dégradation fait intervenir d'autres kinases comme la kinase CK1δ/ε (Casein Kinase 1) qui permettent le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 SCF/β-TRCP (Skp1, Cdc53, F-box proteins and β-Transducin Repeat-Containing Protein) (Zhao et al., 2010)(Liu et al., 2010). Les deux effecteurs de la voie Hippo YAP et TAZ seront décrits plus en détails dans la partie 1.4 de cette introduction.

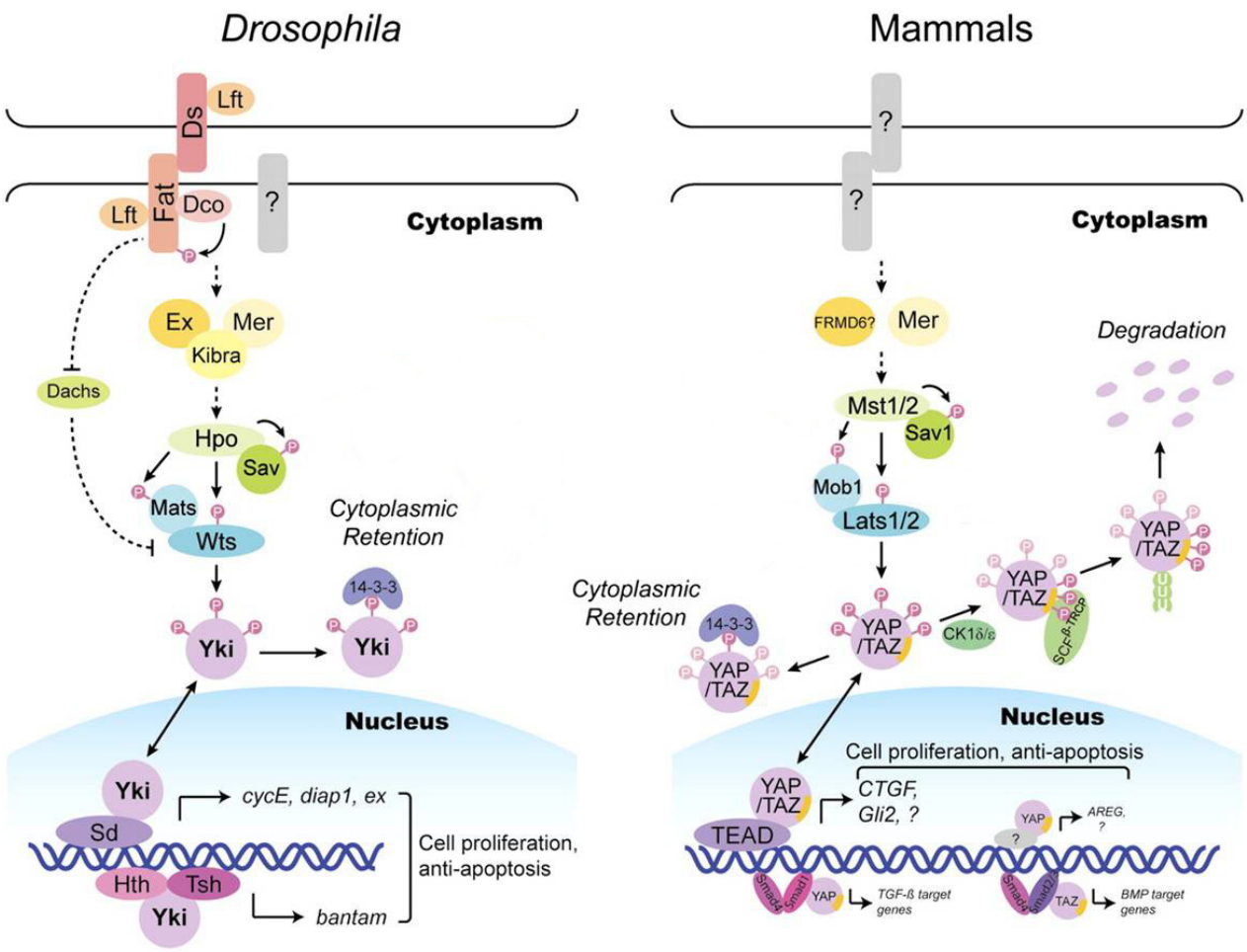


Figure 22: La voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères. Représentation schématique de la voie Hippo dans laquelle les protéines homologues chez la drosophile et les mammifères sont représentées par des couleurs identiques. Les interactions biochimiques directes sont indiquées par des traits pleins tandis que les interactions génétiques pour lesquelles aucune interaction protéine-protéine directe n'a été rapportée sont représentées en pointillés. D'après (Zhao, Li, Lei, & Guan, 2010).

Concernant la régulation en amont des kinases de la voie chez les mammifères, deux homologues de la protéine KIBRA, **KIBRA/WWC1** et **WWC2** (WW domain-Containing protein 1/2) et de la protéine EX, **FRMD1** et **FRDM6** (FeRM Domain containing 1/6) ont été découverts, ainsi qu'un homologue de **MERLIN** (nommé également MERLIN ou NF2 chez les mammifères) (Genevet et al., 2010)(Yu et al., 2010) (Figure 22). Cependant, l'implication de certains homologues chez les mammifères, comme la protéine FRDM6, dans la régulation de la voie Hippo reste controversée (Visser-Grieve, Hao, & Yang, 2012)(Angus et al., 2012)(Bossuyt et al., 2014)(voir paragraphe 1.3). En effet, à quelques mois d'intervalle, les auteurs d'une première étude ont montré que la surexpression de *Frdm6* induit la phosphorylation et donc l'activation de la cascade de kinases MST/LATS dans des cellules de mammifères en culture (Angus et al., 2012), alors que les résultats d'une deuxième équipe montrent qu'au contraire, la protéine FRDM6 possède bien des propriétés de suppresseur de tumeur en culture mais que ces effets sont indépendants de la cascade Hippo (Visser-Grieve et al., 2012). Concernant les récepteurs de la voie Hippo chez les mammifères, la protéine FAT possède bien des homologues chez les mammifères dont FAT4 est l'homologue de la protéine FAT de drosophile. Malgré cette conservation, aucune étude n'a encore permis de démontrer une régulation de la cascade de kinase par cette protéine comme chez la drosophile (Bossuyt et al., 2014). Cependant, plusieurs protéines transmembranaires comme les GPCR (G protein-coupled receptors) ou encore l'E-cadhérine (Kim et al., 2011) ont été décrites comme des régulateurs essentiels de la voie Hippo chez les mammifères. De la même façon que chez la drosophile, étant donné le grand nombre de facteurs impliqués dans la régulation de la voie Hippo, j'ai choisi de consacrer la partie suivante de ce chapitre à leur description.

2. LA REGULATION DE LA VOIE HIPPO

Alors que la signalisation intracellulaire de la voie Hippo aboutissant à l'inhibition des activités nucléaires de YAP et TAZ est aujourd'hui bien compris, la régulation en amont de la cascade de kinases est beaucoup moins claire. Comprendre quels sont les signaux extracellulaires qui régulent l'activation de la voie et par quels mécanismes ces signaux agissent sur la cascade de kinases reste aujourd'hui une question majeure. Ces dernières années, de nombreux facteurs ont été décrits dans la littérature, en particulier chez la drosophile, comme étant des régulateurs de la voie Hippo. Parmi ces molécules, on retrouve notamment une grande variété de kinases (Harvey, Zhang, & Thomas, 2013)(Yu & Guan, 2013), des composants des complexes de polarité,

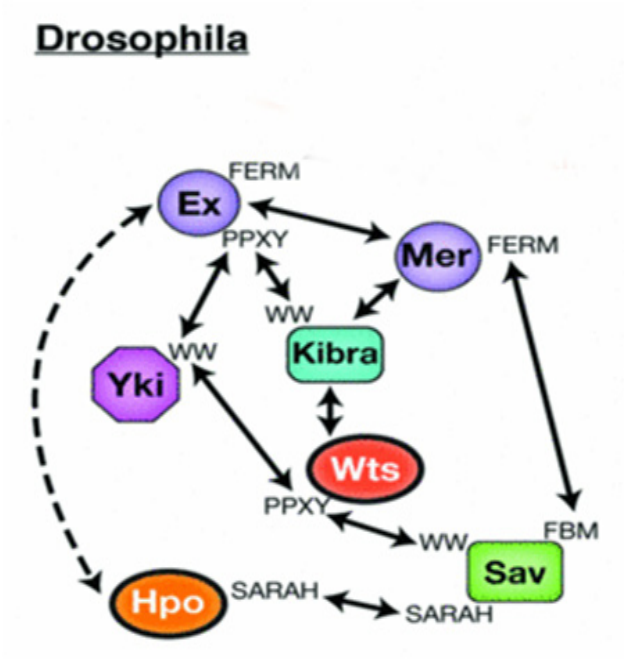


Figure 23: Interactions entre le complexe KEM et la cascade Hippo chez la drosophile. Schéma représentatif des nombreuses interactions protéiques entre le complexe KERM (Kibra/Ex/Merlin) et le cœur de la voie Hippo chez la drosophile. Les flèches représentées ne distinguent pas les effets activateurs et inhibiteurs. Adapté de (Genevet & Tapon, 2011).

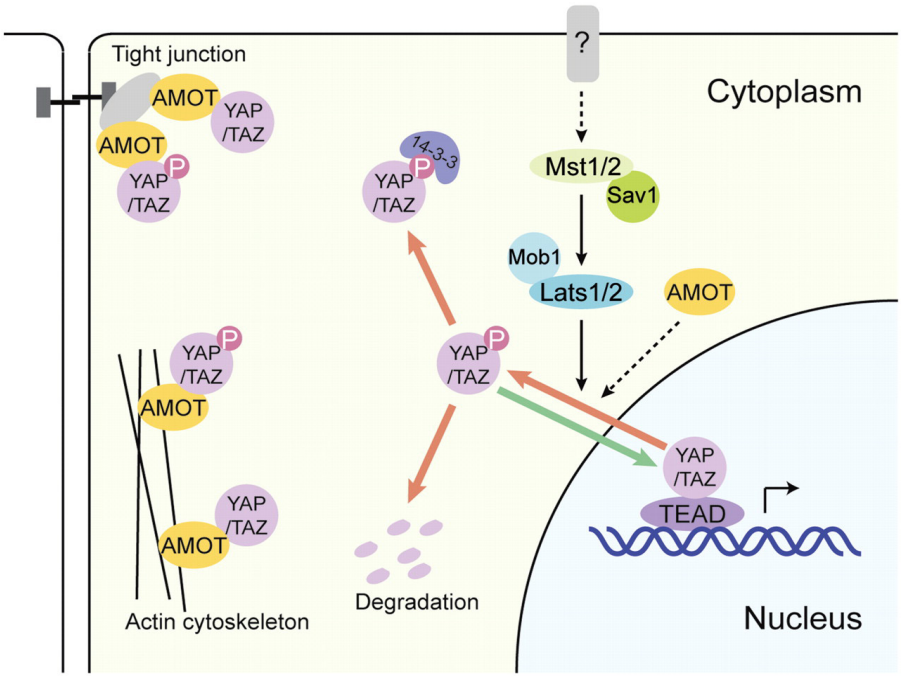


Figure 24: Modèle de la régulation de l'activité de YAP/TAZ par les protéines AMOTs. Dans ce modèle, les protéines AMOTs régulent négativement YAP/TAZ grâce à une interaction physique directe. Cette interaction aboutît à la séquestration de YAP/TAZ dans le cytoplasme. D'après (Zhao, Li, et al., 2011).

des protéines des jonctions cellulaires, des protéines d'adhésion ou encore des régulateurs du cytosquelette (Nishioka et al., 2009)(Kim et al., 2011) (Zhao, Li, et al., 2011)(Boggiano & Fehon, 2012)(Halder, Dupont, & Piccolo, 2012)(Aragona et al., 2013)(Hirate et al., 2013).

1) Le complexe Ex-Mer-Kibra

Le premier régulateur de la voie Hippo à être identifié n'a pas été un récepteur transmembranaire mais deux protéines possédant un domaine d'interaction protéine-protéine, FERM (4.1/ezrin/radixin/moesin), EX et MER (Hamaratoglu et al., 2006)(Pellock et al., 2007). Plus tard, KIBRA, une autre protéines contenant un domaine WW, a été montré comme interagissant avec les protéines EX et MER formant ainsi le complexe KEM (Kibra-Ex-Mer)(Yu et al., 2010)(Baumgartner et al., 2010)(Genevet et al., 2010). Des études *in vitro* montrent que ces trois facteurs phosphorylent et activent HPO et WTS (Yu et al., 2010)(Hamaratoglu et al., 2006). Les mécanismes exacts par lesquels ce complexe régule l'activation des kinases HPO et WTS n'ont pas encore été élucidés mais un grand nombre d'interactions physiques entre l'ensemble de ces facteurs ont été mis en évidence. MER et KIBRA interagissent par exemple avec la protéine adaptatrice SAV, EX lie la kinase HPO et KIBRA interagit également avec WTS (Baumgartner et al., 2010)(Genevet et al., 2010)(Yu et al., 2010). De plus, EX peut également lier directement YKI (Badouel et al., 2009)(H. Oh, 2009)(Figure 23). L'association EX-YKI participe à l'inhibition de ce dernier en le séquestrant en dehors du noyau de façon indépendante de son état de phosphorylation (Badouel et al., 2009)(H. Oh, Reddy, & Irvine, 2009). Ce mécanisme de régulation semble conservé chez les mammifères avec les protéines AMOTs (Angiomotine) capables de séquestrer YAP/TAZ dans le cytoplasme (Figure 24)(Varelas et al., 2010)(Zhao et al., 2011)(Chan et al., 2011). De façon similaire à EX, les protéines AMOT régulent négativement YAP/TAZ en les séquestrant au niveau de la membrane indépendamment de l'activité de la cascade de kinases. Les protéines AMOTs sont ainsi décrites dans la littérature comme des "homologues fonctionnels" de la protéine EX bien que ces deux protéines partagent très peu de séquences communes hormis leur motif PPXY. L'implication de la protéine FRDM6, (véritable homologue de la protéine EX chez les mammifères) dans la régulation de la voie Hippo n'est pas démontré (Bossuyt et al., 2014). Au contraire, la protéine MER reste extrêmement bien conservée chez les mammifères puisqu'il est possible de sauver le phénotype mutant *Mer* de la drosophile avec le gène *Mer* humain (Lajeunesse, Mccartney, & Fehon, 1998).

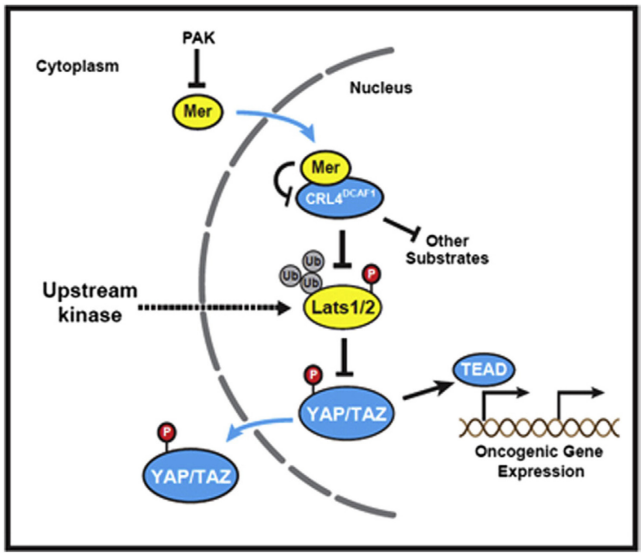


Figure 25: Illustration du mécanisme d'action de la protéine MER chez les mammifères. Dans les cellules déficientes pour la protéine MER, CRL4^{DCAF1} active l'ubiquitinylation des kinases LATS1/2 et supprime ainsi la phosphorylation et la séquestration de YAP dans le cytoplasme. Dans les cellules normales, des signaux anti-mitogéniques permettent l'accumulation de la forme active de MER qui peut alors transloquer dans le noyau, fixer DCAF1 et supprimer l'activité de la CRL4^{DCAF1}. D'après (Li et al., 2014).

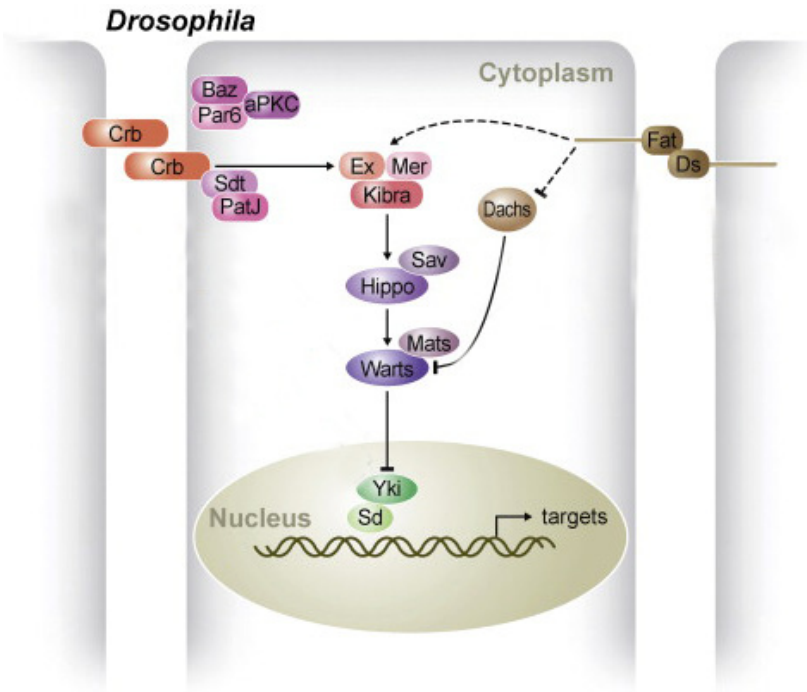


Figure 26: Régulation de la voie Hippo par le complexe Crumbs chez la drosophile. Les lignes en pointillées indiquent des mécanismes inconnus. D'après (Schroeder & Halder, 2012).

Très récemment, une équipe a élucidé en partie le fonctionnement de cette protéine en montrant que MER inhibe une E3 ubiquitine ligase, la $CRL4^{DCAF1}$ responsable de l'ubiquitinylation des protéines LATS dans le noyau (Li & Giancotti, 2010)(Li et al., 2014) (Figure 25). Dans cette étude les auteurs observent ainsi que l'inhibition de la répression exercée par $CRL4^{DCAF1}$ active la transcription des gènes cibles du complexe YAP/TEAD grâce à la destruction des protéines LATS.

2) Les complexes de polarité

La voie de signalisation Hippo possède la particularité d'intégrer des informations concernant le nombre et la taille des cellules d'un organe pouvant ainsi réguler l'homéostasie tissulaire. Chez la drosophile, des études ont montré que beaucoup de protéines impliquées dans la régulation de la polarité cellulaire sont également des régulateurs de la croissance dans les tissus épithéliaux (Hariharan & Bilder, 2006). Parmi ces protéines, il existe trois complexes majeurs: le complexe Crumbs, le complexe aPKC (atypical Protein Kinase C) et les protéines basolatérales de polarité (Lethal giant larvae (Lgl), Discs large (Dlg) et Scribble (Scrib)). L'ensemble de ces protéines établit la polarité apico-basale des cellules épithéliales grâce à des interactions antagonistes. Le complexe Crumbs est un complexe protéique associé aux jonctions serrées localisées dans la partie apicale des cellules épithéliales (Laprise et al. 2011). La protéine CRB (Crumbs) est une protéine transmembranaire possédant trois homologues chez les vertébrés (CRB1-3) et qui forment un complexe en association avec les protéines adaptatrices STARDUST (PALS1/2 chez les mammifères (Protein Associated with Caenorhabditis elegans Lin-7 protein1)) et PATJ (Pals1 Associated Tight Junction). La protéine CRB a récemment été identifié comme un régulateur de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile capable de réguler la localisation subcellulaire de la protéine EX (Figure 26)(Chen et al., 2010)(Grzeschik et al., 2010)(Ling et al., 2010)(Robinson et al., 2010). En effet, CRB possède deux sous-domaines importants au sein de sa partie cytoplasmique: un domaine de liaison aux motifs PDZ, sur lequel se fixe d'autres protéines de polarité et un domaine de liaison aux motifs FERM, sur lequel se fixe la protéine EX *in vitro* (Ling et al., 2010). De récentes études utilisant des formes de la protéine CRB déletée de l'un de ces deux domaines semblent indiquer que le contrôle de la polarité et la prolifération cellulaire par la protéine CRB s'effectue par des interactions protéine-protéine différentes. L'interaction entre CRB et EX stabilise cette dernière au niveau de la partie apicale et active la voie de signalisation Hippo (Ling et al., 2010).

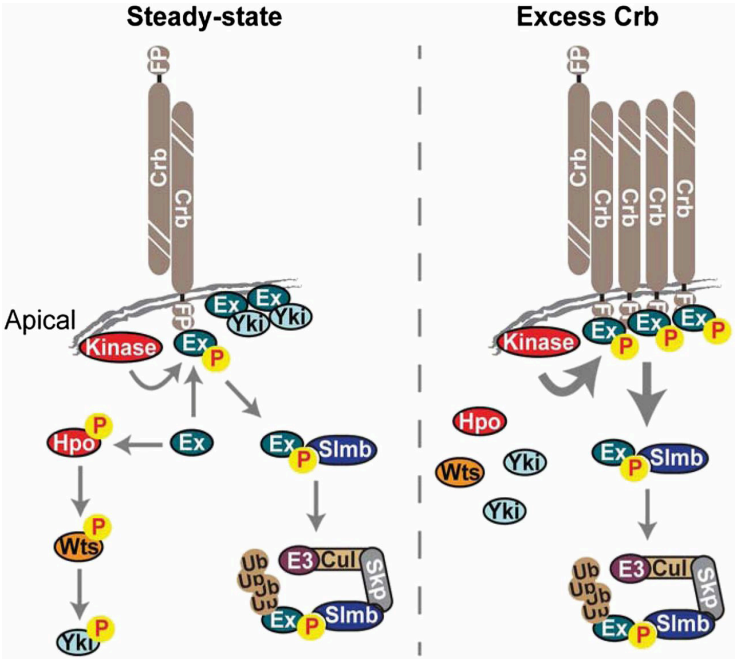


Figure 27: Modèle de régulation de la voie Hippo par la protéine CRB. (**A gauche**) En condition physiologique, CRB est à l'origine d'un équilibre dynamique permettant de réguler la cascade de kinases Hippo. CRB peut à la fois promouvoir l'activation de cette cascade en stabilisant la protéine EX au niveau de la membrane mais aussi empêcher son activation en provoquant la dégradation de EX par le protéasome. (**A droite**) La surexpression de *Crb* fait basculer cette équilibre en activant la phosphorylation de EX et ainsi sa dégradation par l'E3 Ubiquitine ligase SCF $^{Slimb/\beta\text{-}TrCP}$. Cette dégradation empêche ainsi la phosphorylation de YKI par la voie Hippo. D'après (Ribeiro et al., 2014).

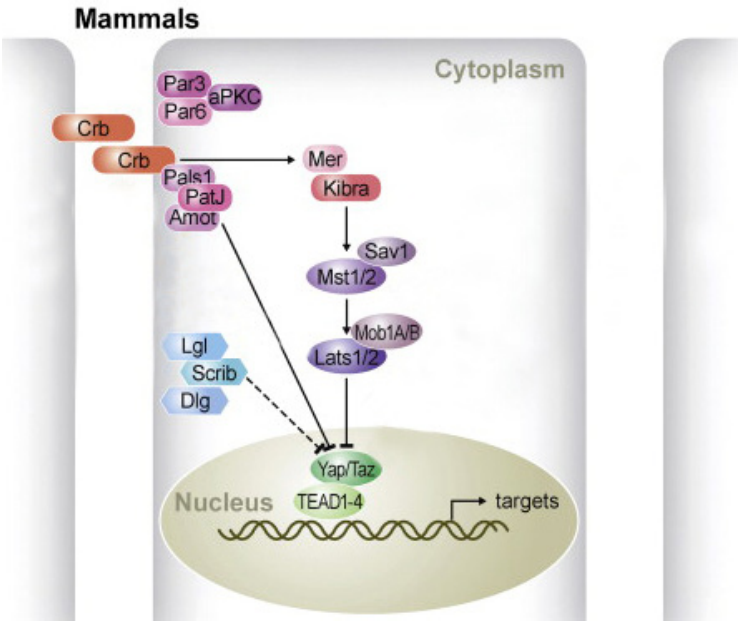


Figure 28: Régulation de la voie Hippo par les complexes de polarité chez les mammifères. Schéma représentatif de la régulation de la voie Hippo par les complexes Crumbs (CRB-PALS1-PATJ), aPKC (aPKC-PAR3-PAR6) et les protéines basolatérales de polarité (SCRIB-DLG-LGL). Les lignes en pointillées indiquent des mécanismes indirects ou inconnus. D'après (Schroeder & Halder, 2012).

Très récemment, une équipe a montré que la protéine CRB n'est pas seulement requise pour stabiliser EX au niveau de la membrane apicale mais pouvait aussi activer sa dégradation *via* l'activation d'une E3 ubiquitine ligase, la SCF $^{Slimb/\beta\text{-}TrCP}$ (Ribeiro et al., 2014). La protéine CRB semble donc être un senseur de la densité cellulaire pouvant modifier rapidement l'activité de YKI en réponse à un changement environnemental (Figure 27). Chez les mammifères, le complexe Crumbs régule également l'activation de la voie Hippo mais par des mécanismes et à des niveaux différents. Dans les cellules de mammifères, CRB3 (l'homologue de CRB) interagit directement avec YAP/TAZ et semble essentiel à leur localisation nucléaire en fonction de la densité cellulaire (Figure 28)(Varelas et al., 2010). En effet, en condition de haute densité cellulaire, le composant du complexe Crumbs, PALS1 est fortement concentré au niveau des membranes apicales et YAP/TAZ sont principalement retrouvés dans le cytoplasme. Au contraire, en condition de faible densité cellulaire, PALS1 est localisé de façon plus homogène et dans ce cas, YAP/TAZ sont majoritairement nucléaire (Varelas et al., 2010). Dans ces expériences, l'inhibition de CRB3 ou de PALS1 est suffisante pour augmenter le niveau de YAP nucléaire dans des cellules épithéliales en culture même en condition de forte confluence. Les mécanismes impliqués dans cette régulation de la localisation de YAP/TAZ ne sont pas encore clairs mais semble faire intervenir les protéines AMOTs (AMOT, AMOTL1, AMOTL2) (Varelas, Samavarchi-Tehrani, et al., 2010)(Figure 28). Ces protéines sont capables de lier YAP/TAZ mais aussi PALS1 et PATJ afin de retenir YAP/TAZ dans le cytoplasme (Chan et al., 2011)(Wang, Huang, & Chen, 2011a)(Zhao, Li, et al., 2011). Elles peuvent également réguler indirectement la localisation de YAP/TAZ en fixant la protéine LATS2 et en augmentant son activité kinase (Paramasivam et al., 2011)(Zhao, Li, et al., 2011)(Wang, Huang, & Chen, 2011b).

Le second complexe de polarité situé dans la région apicale des cellules épithéliales est le complexe aPKC. Ce complexe est composé des protéines Par3 et Par6 (Bazooka et Par6 chez la Drosophile), qui possèdent un domaine de liaison PDZ, ainsi que de la protéine aPKC (Laprise et al. 2011). Chez la drosophile, la surexpression d'une forme active de la kinase aPKC dans les cellules des disques imaginaux entraîne une perturbation de la localisation de Hippo et Rassf et augmente la quantité de Yki dans le noyau (Grzeschik et al., 2010). Chez les mammifères, la protéine aPKC interagit directement avec Kibra et séquestre cette dernière au niveau de la membrane apicale (Büther et al., 2004)(Yoshihama et al., 2011). Il semble donc que le complexe aPKC régule la voie de signalisation Hippo de façon indépendante du complexe Crumbs et à des niveaux différents.

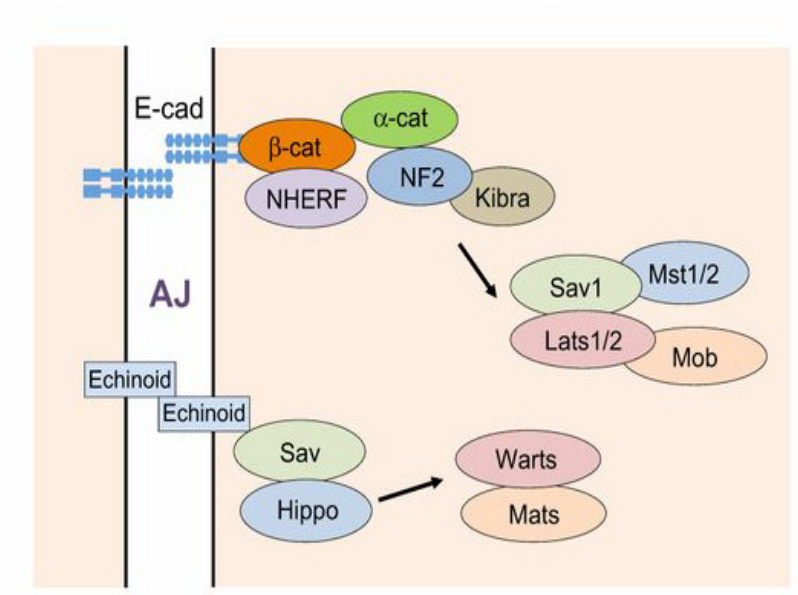


Figure 29: Régulation de la voie Hippo par les composants des jonctions adhérentes. Les complexes cadhérine/caténine localisés au niveau des jonctions adhérentes (AJ) régulent la cascade de kinases Hippo aussi bien chez les mammifères que chez la drosophile. D'après (Gumbiner & Kim, 2014).

A l'opposé de ces deux complexes apicaux, les protéines SCRIB, LGL et DGL sont localisées dans le domaine baso-latéral (Figure 28). Chez la drosophile, la déplétion de la protéine SCRIB ou LGL entraîne une activation de YKI (Grzeschik et al., 2010)(Menéndez et al., 2010). Ces mécanismes restent conservés chez les mammifères. SCRIB régule positivement les kinases de la voie Hippo et sa perte de fonction active l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ (Cordenonsi et al., 2011). Le module Scrib agit comme un suppresseur de tumeur au moins en partie en inhibant l'activité de Yki/YAP/TAZ.

3) Les jonctions cellulaires

Les cellules épithéliales adhèrent les unes aux autres grâce aux jonctions cellulaires comme les jonctions serrées, les desmosomes et les jonctions adhérentes. De nombreux régulateurs agissant en amont de la voie de signalisation Hippo sont également connus pour être des composants des jonctions cellulaires, en particulier des jonctions adhérentes. Ces dernières sont composées de larges protéines transmembranaires comme les nectines ou les cadhérines qui intéragissent par l'intermédiaire de leur domaine cytoplasmique aux caténines (∝-caténine, β-caténine et p120 caténine). Les cadhérines ont ainsi été décrites dans la littérature comme étant des activateurs de la voie Hippo (Nishioka et al., 2009)(Kim et al., 2011). Cette stimulation par les cadhérines fait intervenir l'∝ et la β-caténine bien qu'une autre régulation indépendante de l'∝-caténine a également été mis en évidence dans les kératinocytes primaires de souris (Figure 29) (Schlegelmilch et al., 2011)(Silvis et al., 2012). Les protéines MER et KIBRA sont également liées à la stimulation de la cascade Hippo par les cadhérines même si MER ne semble pas indispensable à cette régulation dans certains types cellulaires (Kim et al., 2011). Chez la drosophile, la protéine ECHINOID, protéine présente au sein des jonctions adhérentes, active la voie Hippo en interagissant directement avec SAV (Figure 29) (Yue et al., 2012). Les disques imaginaux chez lesquels la protéine ECHINOID a été inhibée présente une croissance anormale et montre une augmentation de l'activité transcriptionnelle de YKI (Yue et al., 2012). Dans les cellules de mammifères en culture, l'expression des différents composants des jonctions adhérentes comme l'E-cadhérine et l'∝-caténine est indispensable afin de limiter la prolifération cellulaire par inhibition de contact. La perte de cette inhibition a été observée lorsque les protéines KIBRA, MER ou LATS sont inhibées, suggérant que la voie de signalisation Hippo joue un rôle essentiel dans ce mécanisme (Zhao et al., 2007)(Ota & Sasaki, 2008)(Kim et al., 2011)(Silvis et al., 2012). YAP se localise majoritairement dans le cytoplasme dans les cultures de cellules confluentes mais transloque dans le noyau lorsque l'∝-caténine est inhibée

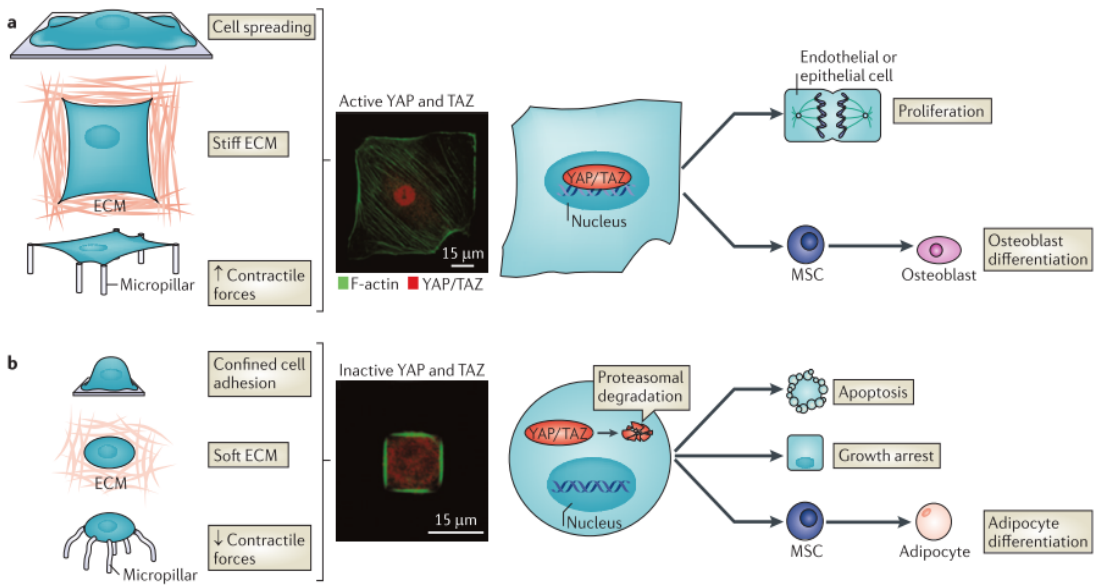


Figure 30: YAP/TAZ sont des capteurs des propriétés mécaniques des cellules et de l'environnement. (**a**) YAP/TAZ sont localisés dans le noyau lorsque les conditions environnementales favorisent la formation de forces de résistance intracellulaires importantes (comme c'est le cas lorsque les cellules peuvent multiplier les contacts d'adhésion avec leur substrat ou lorsque la matrice extracellulaire est rigide puisque la surface d'étalement croît avec la rigidité de la surface) ou encore lorsque les cellules sont étirées artificiellement. Un immunomarquage de YAP/TAZ (en rouge) et des filaments d'actine (en vert) montre la localisation nucléaire des deux effecteurs de la voie Hippo dans une cellule endothéliale lorsque cette dernière est contrainte à de nombreuses tensions. Dans ces conditions, YAP/TAZ sont nécessaires à la prolifération cellulaire ou encore lors de la différenciation spécifique des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes. (**b**) Au contraire, dans des conditions où les forces contractiles sont faibles (peu de contacts d'adhésion comme c'est le cas sur une matrice extracellulaire souple), YAP/TAZ sont localisés dans le cytoplasme. D'après (Halder et al., 2012).

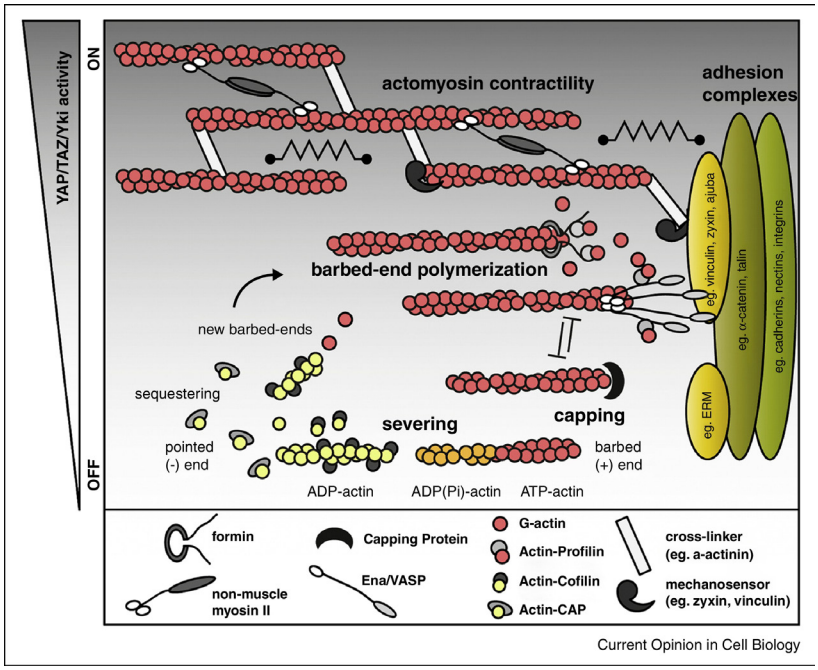


Figure 31: Régulation de l'activité de YAP/TAZ/YKI par le cytosquelette d'actine. L'activité de YKI/YAP/TAZ (à gauche du schéma) est corrélée à la présence de F-actine dans la cellule. Les lignes discontinues représentent les forces de résistance intracellulaires (voir figure 30). D'après (Gaspar & Tapon, 2014).

(Kim et al., 2011). La voie de signalisation Hippo semble donc être l'un des mécanismes essentiels de l'inhibition de contact. Enfin, un autre composant des jonctions adhérentes, la PTPN14 (Protein Tyrosine Phosphatase 14) joue également un rôle dans la régulation de la voie de signalisation Hippo. La PTPN14 interagit avec YAP grâce à son motif PPxY (Huang et al., 2013)(Liu et al., 2013)(Wang et al., 2012). Comme précédemment, cette interaction aboutit à une augmentation de la localisation cytoplasmique de YAP et donc à une réduction de son activité transcriptionnelle. Toutes ces données soulignent l'importance des contacts cellule-cellule dans la régulation de la voie de signalisation Hippo et montrent l'importance des jonctions cellulaires, associées aux différents complexes de polarité, qui servent de "capteur" de la densité cellulaire. En effet, ces jonctions intercellulaires semblent contrôler négativement la croissance tissulaire à travers la séquestration de YAP.

4) Forces mécaniques et cytosquelette d'actine

La troisième régulation importante bien qu'encore mal comprise est la régulation de la voie de signalisation Hippo due aux propriétés physiques des cellules. Les cellules répondent aux forces mécaniques de leur environnement comme l'élasticité de la matrice extracellulaire, les forces de tractions ou au contraire de compression exercées par les cellules voisines (Halder et al., 2012). Récemment, plusieurs études ont montré que la perturbation de l'ensemble de ces propriétés pouvait altérer l'activité de la voie (Wada et al., 2011)(Dupont et al., 2011)(Halder et al., 2012). Il est déjà connu que la rigidité de la matrice sur laquelle repose les cellules peut influencer leur taux de prolifération ou encore leur différenciation. C'est par exemple le cas des cellules souches mésenchymateuses qui se différencient préférentiellement en ostéoblastes sur une matrice rigide alors qu'elles se différencient en adipocytes lorsqu'elle se situent sur un support plus souple (McBeath et al., 2004)(Engler et al., 2006). L'activité de YAP/TAZ semble jouer un rôle important dans cette régulation. La localisation de ces deux effecteurs est modifiée en fonction de la rigidité de la matrice sur laquelle se trouve les cellules (Dupont et al., 2011). De plus, leur activité semble essentielle à cette réponse cellulaire puisque leur inhibition empêche la différenciation ostéoblastique normalement induite sur un environnement rigide (Dupont et al., 2011)(Figure 30). En plus de l'élasticité du substrat, l'activité de la voie Hippo semble être également modifiée par la morphologie des cellules (Wada et al., 2011)(Dupont et al., 2011). L'utilisation de substrats de micro-piliers obligeant les cellules à adopter une forme plus ou moins aplatie selon l'écart de ces piliers montre que les cellules plus étalées possèdent une localisation de YAP majoritairement nucléaire par rapport aux cellules possédant une forme plus

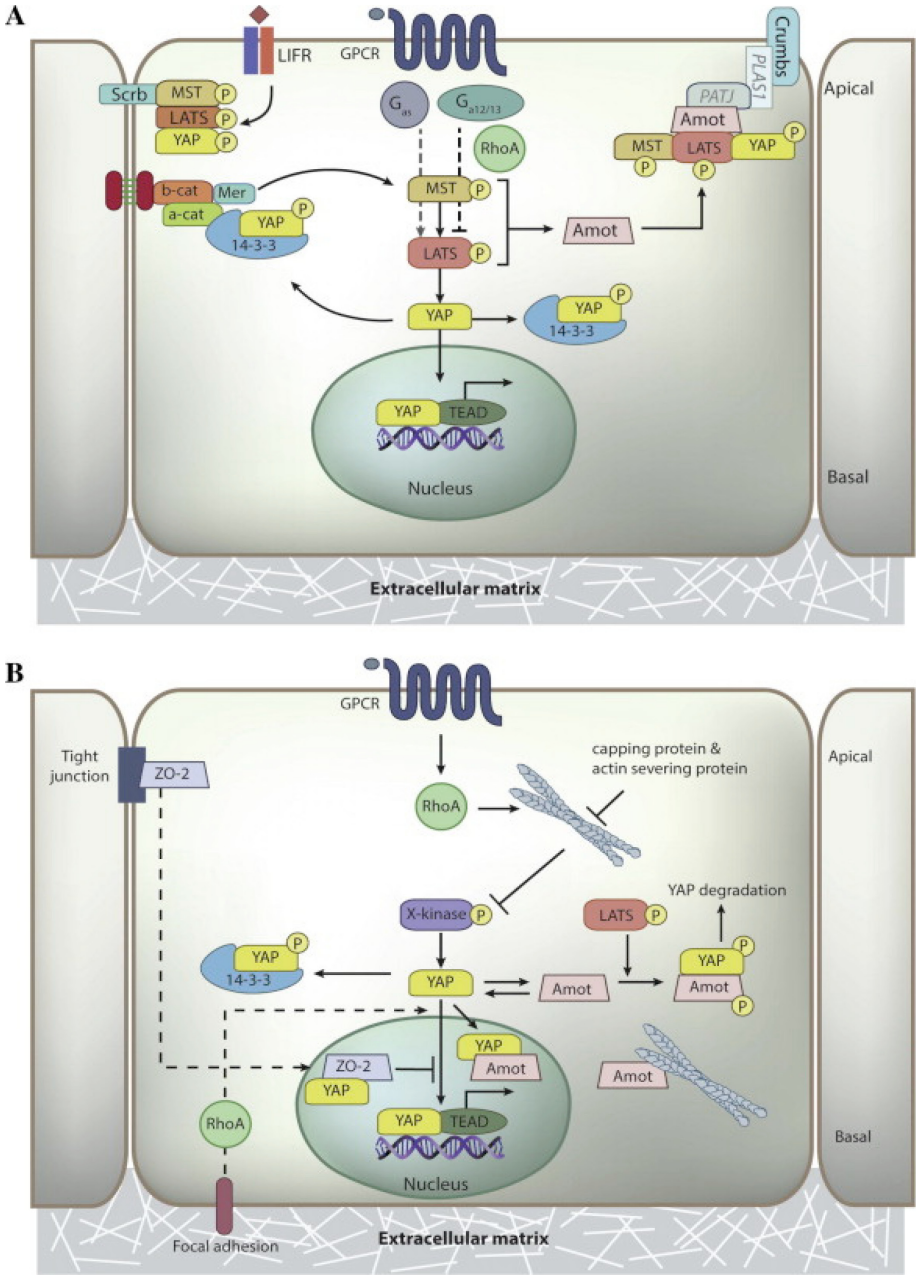


Figure 32: Représentation schématique de la voie canonique et non canonique de la voie Hippo. (**A**) Dans la voie Hippo canonique, les jonctions cellulaires, les complexes de polarité et les GPCRs régulent l'activité de YAP/TAZ par l'intermédiaire de la cascade de kinases MST/LATS. (**B**) Au contraire, dans la voie Hippo non canonique, ces régulations ne font pas intervenir les kinases MST et LATS. Cette régulation semble faire intervenir une autre kinase non identifiée (X-kinase) qui posséderait la capacité de phosphoryler YAP/TAZ sur la même sérine que les kinases LATS1/2. En parallèle, YAP/TAZ sont également régulés directement par les protéines AMOTs. D'après (Low et al., 2014).

arrondie (Dupont et al., 2011) (Figure 30). Il est important de noter que dans ces expériences, la surface cellulaire en contact avec la matrice extracellulaire ne change pas, seule la morphologie de la cellule est modifiée. L'observation que les modifications physiques de l'environnement affectent l'activité de la voie de signalisation Hippo pose la question de savoir comment ces stimuli mécaniques sont captés et transduits par cette voie de signalisation? Les travaux publiés ces dernières années semblent indiquer que le cytosquelette d'actine pourrait être un intermédiaire crucial de cette régulation (Yu & Guan, 2013)(Gaspar & Tapon, 2014). Les filaments d'actine participent à la régulation de nombreux processus cellulaires comme le maintien ou la modification de la morphologie des cellules, leurs mouvements, la division, l'endocytose ou encore le trafic intracellulaire. L'application de forces mécaniques externes provoque d'importants changements sur le cytosquelette d'actine. Par exemple, l'étirement d'une cellule provoque l'activation de la protéine RhoA et de la myosine responsable de la formation des fibres de stress. De cette façon, la régulation de la localisation de YAP/TAZ par différents stress mécanique fait intervenir à la fois les filaments d'actine (F-actine) et les GTPases de la famille Rho (Dupont et al., 2011)(Zhao et al., 2012)(Wada et al., 2011). Dans ces travaux, les auteurs montrent que la perturbation du réseau d'actine ou l'inhibition spécifique de Rho inactive YAP. Au contraire, l'activation de la polymérisation des filaments d'actine provoque leur activation (Figure 31) (Sansores-Garcia et al., 2011). La régulation de *Yki* chez la drosophile par la F-actine a également été démontrée *in vivo*. Dans ce modèle, la perturbation de la polymérisation du réseau d'actine entraîne une activation de Yki associée à un des phénotypes d'excès de croissance (Sansores-Garcia et al., 2011). Les mécanismes impliqués dans la régulation de YAP/TAZ/YKI par le cytosquelette d'actine et par les différents stress mécaniques décrits précédemment ne sont pas encore bien compris. Dans la littérature certains travaux semblent indiquer que l'inhibition de *Lats1/2* est insuffisant pour sauver l'activité de YAP/TAZ dans les cellules cultivés sur un support souple (Dupont et al., 2011) alors qu'au contraire d'autres travaux montrent que le détachement des cellules ou leur culture sur une matrice rigide activent les kinases LATS1/2 (Zhao et al., 2012). Il est donc possible que cette régulation fasse intervenir deux mécanismes différents dépendant ou non des kinases de la voie Hippo. Ces effets ont donc poussés les chercheurs à adopter une nouvelle convention dans la littérature visant à nommer "voie hippo canonique" la voie faisant intervenir une régulation directe de YAP/TAZ par les kinases LATS en opposition à la voie "non canonique" impliquant une régulation de YAP/TAZ indépendante des kinases de la voie Hippo (Figure 32).

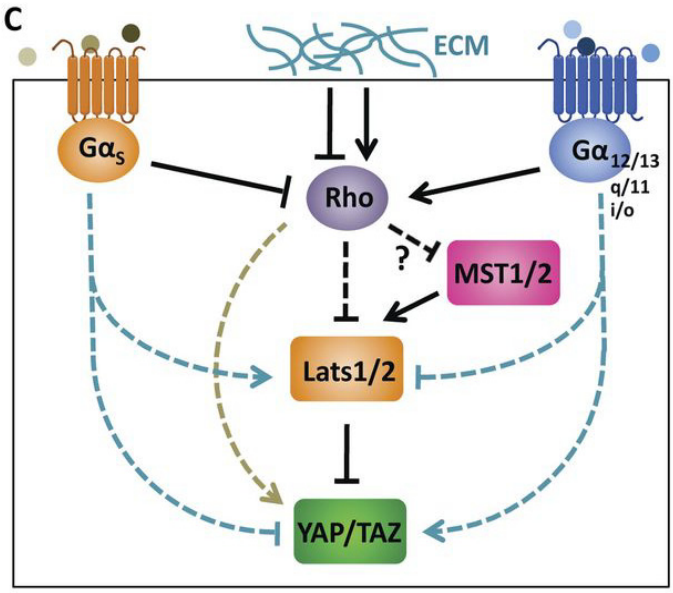


Figure 33: Régulation de la voie Hippo par le cytosquelette d'actine et les GPCRs. Schéma représentatif de la régulation de la cascade de kinases Hippo par les récepteurs GPCRs et les filaments d'actine. Les ligne en pointillés indiquent des mécanismes indirects ou non élucidés. D'après (Yu & Guan, 2013).

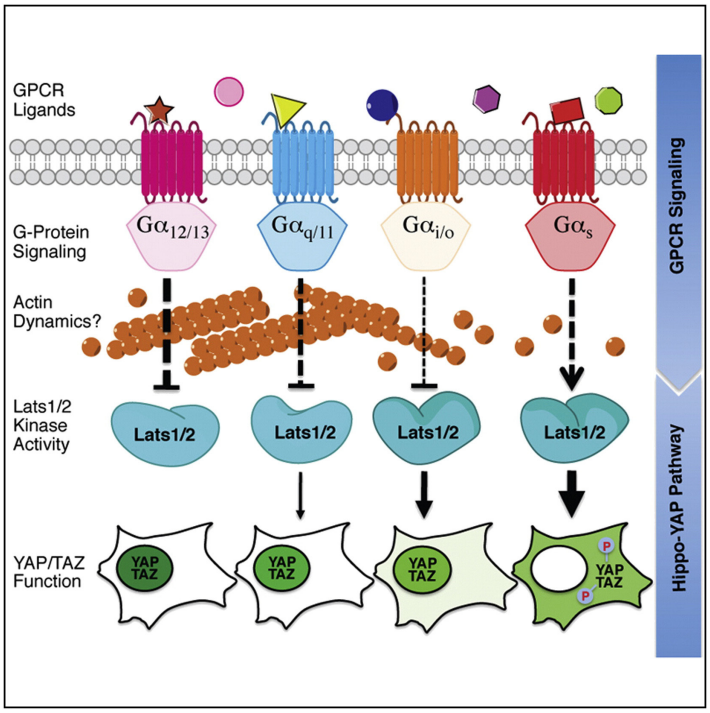


Figure 34: La régulation de la kinase LATS par les différents GPCRs. La LPA et la S1P régulent positivement l'activité nucléaire de YAP/TAZ en activant les GPCRs couplés aux protéines $G\alpha_{12/13}$ $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{i/o}$. Au contraire, certains ligands des GPCRs couplés aux protéines $G\alpha_s$ comme l'épinéphrine et le glucagon empêche la localisation nucléaire de YAP/TAZ en régulant positivement les protéines LATS1/2. D'après (Yu et al., 2012).

5) Les récepteurs couplés aux protéines G

La plupart des voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la croissance au cours du développement sont activées par la fixation de molécules extracellulaires solubles comme les facteurs de croissance, les hormones, les cytokines...etc. Cependant, jusqu'à très récemment, aucune régulation de la voie de signalisation Hippo par ce type de molécule n'avait encore été mis en évidence. Après l'observation que du sérum pouvait être utilisé comme un puissant activateur de YAP/TAZ, deux équipes ont identifié les molécules essentiels à cette régulation: la LPA (lysophosphatidic acid) et la S1P (sphingosine-1-phosphate) (Miller et al., 2012)(Yu et al., 2012). D'autres expériences ont ensuite démontré que la LPA et la S1P régulent positivement l'activité de YAP/TAZ en se fixant aux GPCRs (récepteurs couplés aux protéines G) à la surface cellulaire. La famille des GPCRs est une très large famille de récepteurs qui partagent tous une unité fonctionnelle commune formant sept domaines transmembranaires. Lors de leur activation, ces récepteurs activent leur signalisation *via* différentes protéines G hétérotrimériques: les protéines G∝12/13-; G∝q/11- ou encore G∝i/o- régule positivement l'activité de YAP/TAZ alors qu'au contraire, les protéines G∝s- inhibe cette activité (Figure 33) (Yu et al., 2012)(Yu & Guan, 2013). La voie de signalisation Hippo peut donc être à la fois activée et inhibée par les GPCRs. L'activation des GPCRs par la LPA et la S1P provoque l'inhibition des kinases LATS1/2 et la délétion de Lats1/2 bloque partiellement la phosphorylation de YAP induite par une carence en sérum (Figure 34) (Miller et al., 2012)(Yu et al., 2012). Au contraire, les kinases MST1/2 ne semblent pas intervenir dans cette régulation. Enfin, de façon intéressante, les GTPases RHO et le cytosquelette d'actine sont des effecteurs connus de la voie de signalisation des GPCRs et sont aussi requis pour la régulation de YAP/TAZ par la LPA et la S1P. Les régulations de YAP/TAZ par les forces mécaniques et les GPCRs sont donc intimement liées et semblent converger vers la modulation du cytosquelette d'actine.

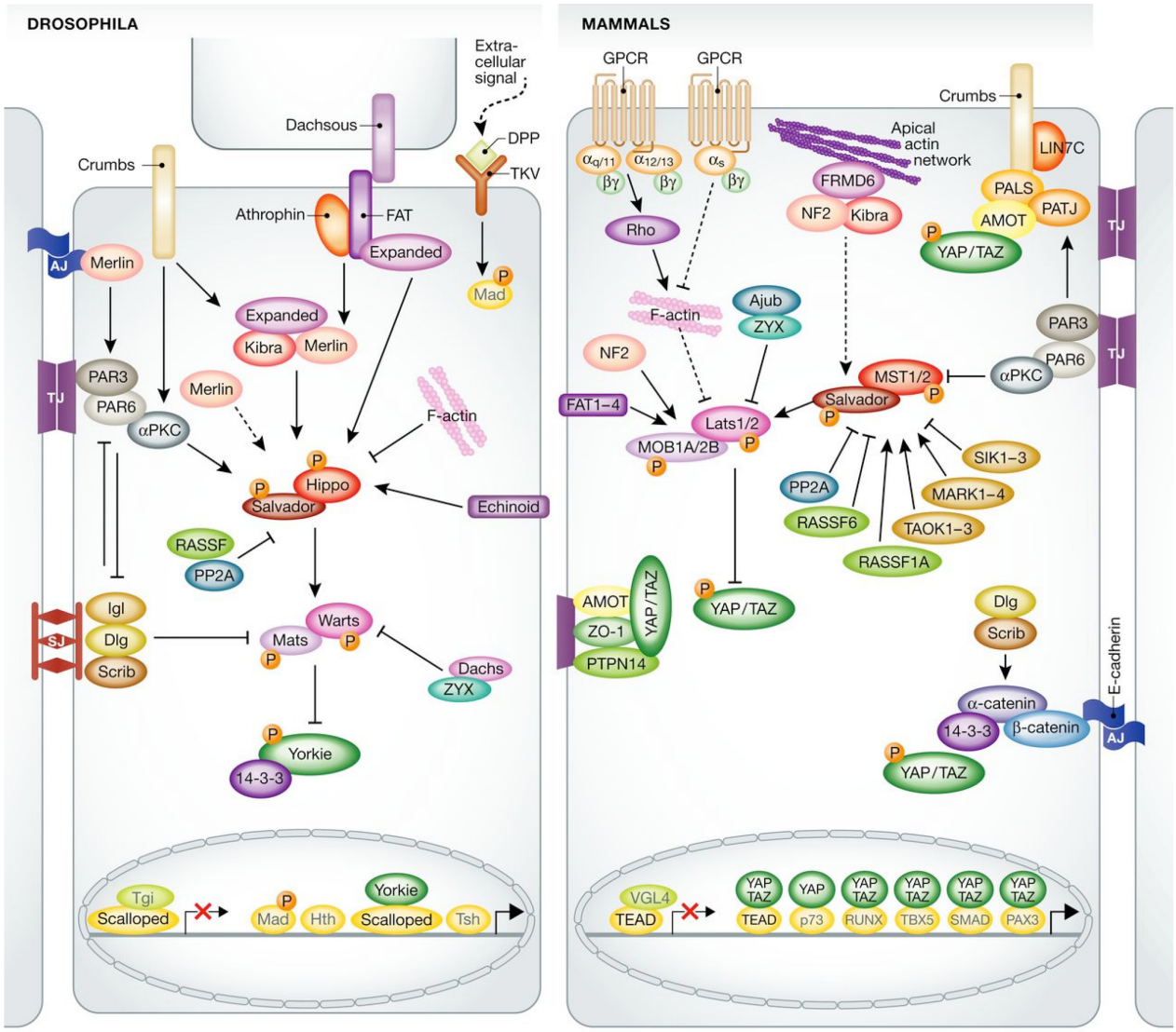


Figure 35: Schéma de l'ensemble de la régulation de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile et les mammifères. Les cellules sont représentées avec leurs jonctions cellulaires: les jonctions adhérentes (**AJ**) et les jonctions serrées (**TJ**). D'après (Mo, Park, & Guan, 2014).

Aujourd'hui, la voie de signalisation Hippo est souvent qualifiée de "réseau Hippo" en raison du nombre important de régulation auxquelles elle est soumise (Figure 35). Comme le montre cette figure, la description que j'ai réalisée dans cette partie est loin d'être une liste exhaustive étant donné le grand nombre de régulateurs agissant en amont de la cascade Hippo. L'explosion du nombre de publications dans ce domaine a en effet permis une véritable avancée dans la compréhension de la régulation de la cascade de kinases ces dernières années même si les connexions entre toutes ces régulations ne sont pas encore bien comprises.

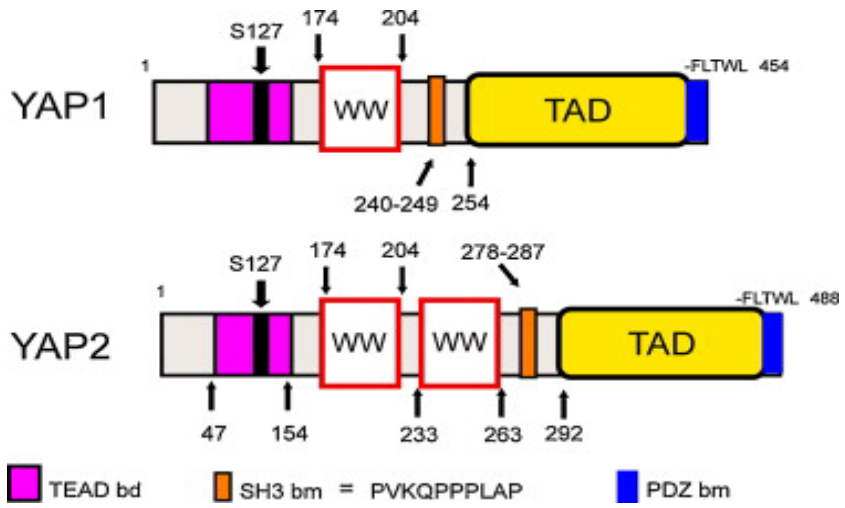


Figure 36: Représentation schématique de la structure des deux isoformes principales de la protéine YAP. Structure moléculaire des deux isoformes de la protéine YAP. Le domaine de liaison des protéines TEADs (TEAD bd), les domaines WW (domaine possédant deux tryptophanes conservés), le motif de liaison SH3 (SH3 bm), le domaine de transactivation (TAD) et le domaine de liaison des motifs PDZ (PDZ bm) sont indiqués sur le schéma. D'après (Marius Sudol, Shields, & Farooq, 2012).

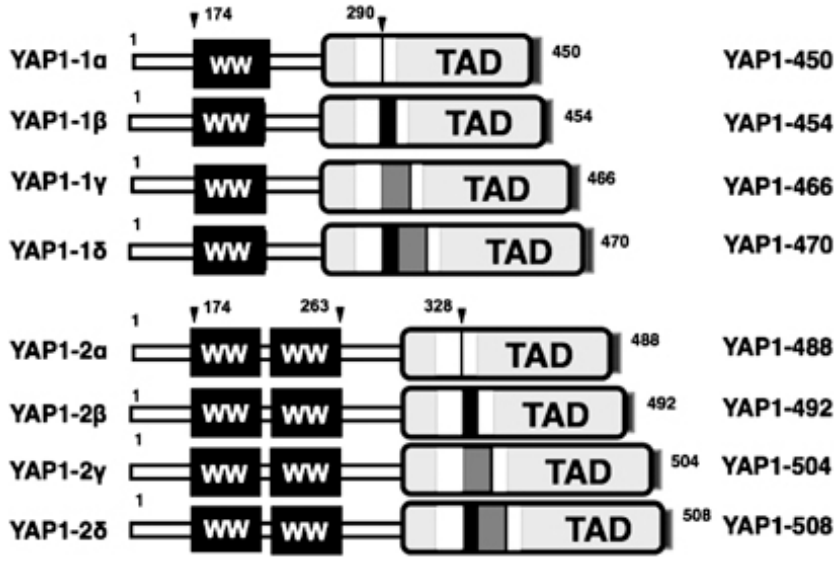


Figure 37: Représentation schématique des 4 isoformes de YAP1 et des 4 isoformes de YAP2. Le nombre d'acides aminés de chaque isoforme est indiqué à droite. La localisation des domaines WW dans la région N-term est montrée par les têtes de flèches noires. Le domaine TAD (transcription activation domain) de YAP1-450 et 488 contient un motif leucine zipper (rectangle blanc). Ce motif est interrompu à la position 290 dans les isoformes YAP1-1 et à la position 328 pour les isoformes YAP1-2 par une extension de l'exon 5 (rectangle noir) et/ou de l'exon 6 (rectangle gris). D'après (M Sudol, 2013).

3. LES EFFECTEURS DE LA VOIE HIPPO

1) Structure de YAP et TAZ

YAP/TAZ sont les deux effecteurs principaux de la voie de signalisation Hippo chez les vertébrés (Hong & Guan, 2012). Ces deux protéines partagent de nombreuses similitudes structurales. Initialement identifié comme un partenaire de la protéine c-YES chez le poulet, YAP, une protéine de 65kDa a d'abord été nommé YAP65 (Sudol, 1994). Ce facteur a été la première protéine identifiée possédant un domaine WW, caractéristique de la voie de signalisation Hippo (Sudol et al., 1995). Le WW est un domaine d'interaction protéique contenant, en partie, deux résidus tryptophane séparés par une vingtaine d'acides aminés. Une étude a caractérisé chez l'humain une deuxième isoforme de YAP contenant deux domaines WW en tandem contrairement au YAP65 (Komuro et al., 2003). Cet isoforme a donc ensuite été nommé YAP2 et le YAP65 renommé YAP1 (Figure 36). En réalité, des études ont réussi à identifier 8 isoformes de YAP ayant pour origine un épissage différent au niveau des exons localisés dans le domaine d'activation de la transcription de YAP (Figure 37). Afin de simplifier la nomenclature, il est plus facile de distinguer seulement les isoformes YAP1 et YAP2. La plupart du temps, la nomenclature YAP fait référence à l'isoforme YAP2, majoritaire chez la souris et l'humain (Komuro et al., 2003). De façon intéressante, on retrouve aussi ce tandem WW chez d'autres espèces comme la drosophile, l'oursin ou encore le xénope. Chez ce dernier, la seule isoforme de la protéine YAP contient tous les domaines d'interaction protéine-protéine ainsi que le domaine d'activation de la transcription (Figure 38). Plus tard, le paralogue de YAP, la protéine TAZ a été caractérisé et contient également un domaine WW. Alors que la protéine YAP reste très conservée entre la drosophile et l'humain, TAZ semble spécifique des vertébrés. En effet, en terme d'organisation structurale et de similarité de séquence, YKI est plus proche de YAP que de TAZ (Jianbin Huang et al., 2005)(Figure 39). Le WW de YAP et TAZ se lie au motif PPxY que l'on retrouve dans une grande variété de protéines comme RUNX1 (Yagi et al., 1999), RUNX2 (Kanai et al., 2000)(Cui et al., 2003a)(Zaidi et al., 2004)(Hong et al., 2005a) ou encore p73 (Strano et al., 2001). En plus de ce domaine WW, la partie N-terminale de YAP/TAZ contient un domaine de liaison aux protéines TEF/TEAD (Vassilev et al., 2001) (Mahoney et al., 2005) ainsi qu'un motif de fixation à la protéine 14-3-3 (Kanai et al., 2000)(Jianbin Huang et al., 2005). Bien que ces deux domaines soient conservés entre YAP et TAZ, le domaine de liaison aux protéines TEF/TEAD de TAZ n'est pas exactement identique à celui de YAP suggérant qu'il existe là encore des différences dans la

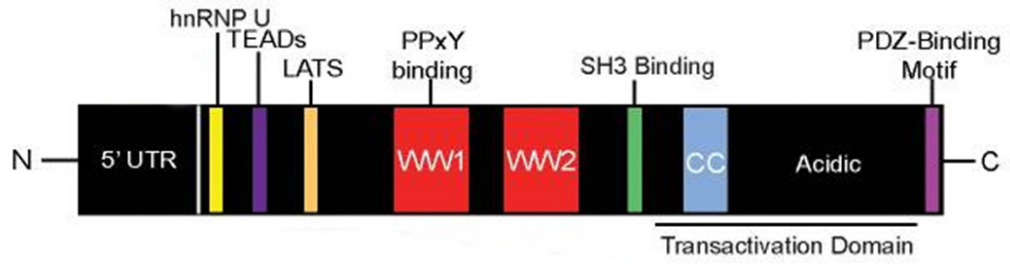


Figure 38: Structure de la protéine YAP chez le xénope. La protéine YAP chez le xénope contient l'ensemble des domaines fonctionnels et d'interaction protéine-protéine comme le domaine de liaison aux protéines TEAD (en violet), le site de phosphorylation par les LATS (en orange), deux domaines WW (en rouge), le domaine de liaison SH3 (en vert), la région "coiled-coil" (en bleu), le domaine de transactivation (souligné) et le motif PDZ (en rose). D'après (Gee et al., 2011).

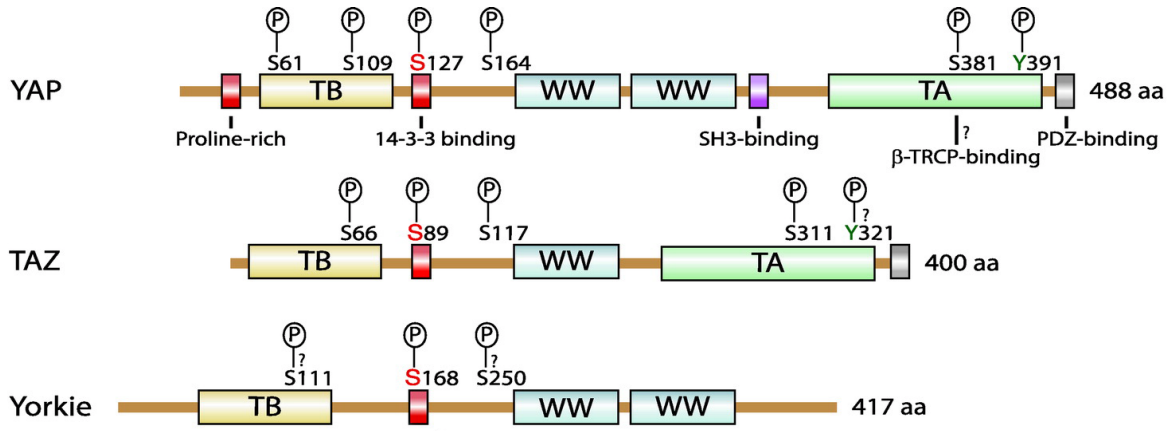


Figure 39: Structure protéique des effecteurs YAP/TAZ/YKI. Comparaison de l'organisation des domaines conservés chez les protéines YAP et TAZ humaines et chez la protéine YKI. Les sites de phosphorylation des sérines (S) et des tyrosines (Y) sont indiqués sur la figure. D'après (Wang et al., 2009).

fixation des facteurs TEADs (Hau et al. 2013). YAP possède aussi un domaine riche en résidus proline et un motif de liaison SH3, absent de son paralogue TAZ (Sudol et al., 1995)(Yagi et al., 1999)(Kanai et al., 2000)(Espanel & Sudol, 2001). Le domaine riche en proline a notamment été montré comme jouant un rôle dans la fixation de certaines "nuclear matrix RNA binding protein" importantes dans la traduction des ARNm. Le motif de liaison SH3 intervient des les interactions entre YAP et d'autres protéines incluant les kinases YES et SRC (Sudol, 1994). Dans leur partie C-terminale, YAP et TAZ possèdent un important domaine de transactivation ainsi qu'un motif de liaison PDZ (Sudol et al., 1995)(Yagi et al., 1999)(Kanai et al., 2000). Aucun de ces domaines n'est conservé chez la drosophile (Jianbin Huang et al., 2005). Le motif de liaison aux domaines PDZ de YAP et TAZ est essentiel pour leur activité transcriptionnelle et pour leur translocation nucléaire (Kanai et al., 2000)(Oka et al., 2010). L'analyse structurale des deux effecteurs de la voie Hippo, YAP et TAZ, montre de nombreuses similitudes dans leurs structures protéiques suggérant que ces deux protéines partagent une régulation et une activité communes. Cependant, il existe aussi quelques différences importantes qui suggèrent à l'inverse que ces deux protéines possèdent aussi des fonctions bien distinctes.

2) Les partenaires de YAP et TAZ

Les deux effecteurs de la voie de signalisation Hippo YAP/TAZ ne possèdent pas de domaine de liaison à l'ADN et doivent donc se lier à divers facteurs de transcription dans le but d'activer la transcription des gènes cibles de la voie. Les facteurs de transcription TEF/TEAD ont été décrits dans la littérature comme les principaux partenaires de YAP et TAZ aussi bien chez la drosophile que chez les mammifères (Zhao et al., 2008)(Zhang et al., 2008)(Heng Zhang et al., 2009a)(Wu et al., 2008)(Goulev et al., 2008). Il existe 4 membres de la famille TEAD chez les mammifères (TEAD1-4) alors qu'il existe seulement un homologue chez la drosophile, SD (Scalloped) (plus proche de la protéine TEAD1). Le domaine N-terminal des TEADs et de SD contient un domaine TEA conservé, capable de reconnaître des séquences d'ADN consensus situées dans la région promotrice de ces gènes cibles (Anbanandam et al., 2006). La partie C-terminale des protéines TEADs est impliquée dans l'interaction avec les co-activateurs de la voie Hippo, YAP et TAZ (Vassilev et al., 2001). Les quatre protéines TEADs sont capables d'interagir à la fois avec YAP et TAZ (Vassilev et al., 2001). L'importance des protéines TEADs pour l'activité de YAP et TAZ a été décrite dans plusieurs modèles.

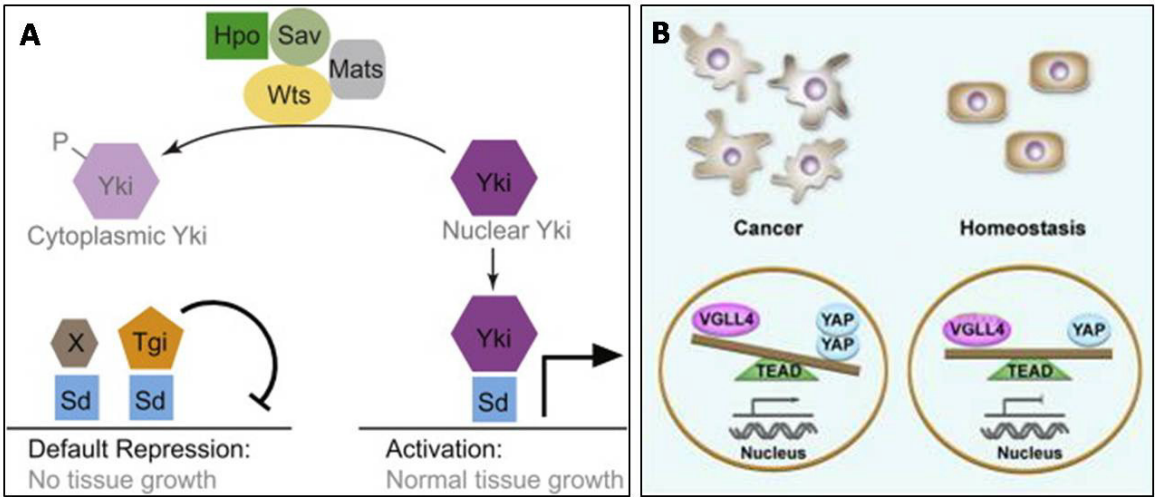


Figure 40: Schéma représentatif du mécanisme de compétition entre YKI/YAP et TGI/VGL4. (**A**) Chez la drosophile, SD possède un rôle de répresseur lorsqu'il est lié à la protéine TGI alors qu'au contraire il possède une activité activatrice lorsqu'il fixe YKI. D'autres co-répresseurs de SD existent chez la drosophile (protéine X) puisque TGI ne joue qu'un rôle partiel dans l'activité inhibitrice de SD dans les disques imaginaux des yeux utilisés dans cette étude comme modèle. D'après (Koontz et al., 2013). (**B**) Le même mécanisme de compétition est observé chez les mammifères entre VGL4 et YAP. Le niveau d'expression de ces deux protéines maintient ainsi un équilibre essentiel à l'homéostasie des tissus dont la perturbation semble être à l'origine de certains cancers. D'après (Jiao et al., 2014).

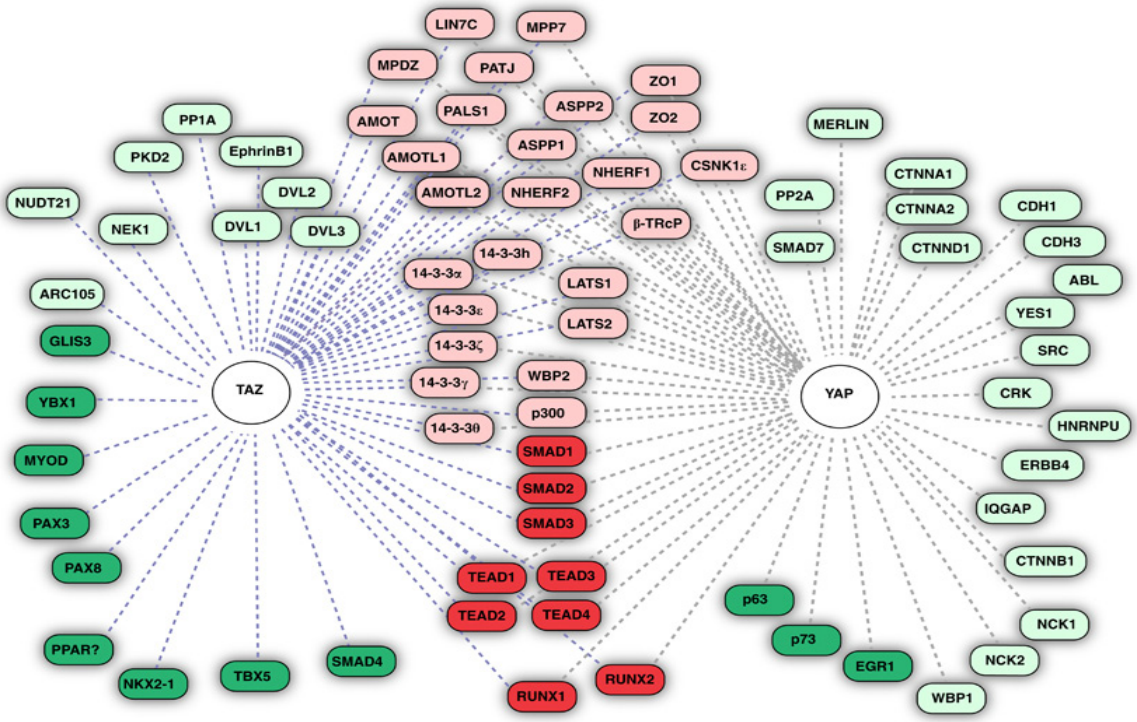


Figure 41: Interactions protéiques de YAP et TAZ. Schéma illustrant les partenaires protéiques connus de YAP et TAZ. Les protéines liant YAP et TAZ sont illustrées en rouge et celles interagissant avec YAP ou TAZ sont en vert. Les facteurs de transcription sont représentés en couleur foncée (rouge ou vert). D'après (Mauviel, Nallet-Staub, & Varelas, 2012).

De façon générale, l'inhibition de TEAD ou l'inhibition de l'interaction YAP-TEAD diminue fortement la transcription des gènes cibles de la voie Hippo et les effets sur la prolifération induit par une surexpression de YAP (Zhao et al., 2008). La sérine 94 de YAP a été montrée comme essentielle pour l'interaction YAP-TEAD et la mutation de ce résidu diminue l'ensemble des effets induits par YAP. De la même façon, les facteurs TEAD sont également des partenaires majeurs de TAZ, essentiels à son activité et à sa localisation nucléaire (Chan et al., 2009)(Heng Zhang et al., 2009b). De façon intéressante, une étude réalisée chez la drosophile indique que SD agit par défaut comme un répresseur de la transcription en liant la protéine TGI dans certains contextes (Koontz et al., 2013). Un mécanisme de compétition semble alors exister entre YKI et TGI afin de lier le facteur de transcription SD et ainsi modifier son activité. De plus, ce mécanisme de compétition semble conservé chez les vertébrés avec l'homologue de TGI, VGL4 (Vestigial-like 4)(Zhang et al. 2014)(Jiao et al., 2014)(Figure 40). Ainsi, l'activité de YAP/TAZ et YKI est majoritairement médiée par les facteurs de transcription TEADs chez les mammifères et SD chez la drosophile. Néanmoins, ces effecteurs peuvent également lier d'autres facteurs de transcription. Dans les cellules progénitrices de l'œil par exemple, YKI interagit avec le facteur de transcription HTH (Homothorax), une protéine à homéoboîte contenant un domaine TALE (Three Amino acid Loop Extension) aussi bien qu'avec le facteur TEASHIRT, un membre de la famille des protéines à doigt de zinc. La liaison de ces deux facteurs permet l'activation de la transcription spécifique de certains gènes cibles comme le micro ARN *Bantam* (voir partie 1.3)(Zhang, Zhou, & Pignoni, 2011)(Peng, Slattery, & Mann, 2009b). Chez les mammifères, YAP et TAZ sont également capable de lier d'autres facteurs. YAP interagit avec les facteurs SMAD1, RUNX, ErbB4 et p73 (Yagi et al., 1999)(Strano et al., 2001)(Komuro et al., 2003)(Omerovic et al., 2004)(Alarcón et al., 2009) alors que TAZ fixe les facteurs RUNX, PPARγ, PAX3, TBX5 et TTF1 (Hong et al., 2005a)(Cui et al., 2003a)(Murakami et al., 2005) (Park et al., 2004)(Murakami et al., 2006). De plus, YAP/TAZ se lient aussi à d'autres facteurs grâce à leur domaine "coiled-coil" comme les protéines SMAD2/3 (Varelas et al., 2008). Les avancées récentes de la spectrométrie de masse ont permis de multiplier les analyses d'"interactome" visant à identifier l'ensemble du réseau d'interaction des protéines YAP et TAZ (Kohli et al., 2014) Dans ces travaux, les auteurs confirment généralement les interactions déjà connues et permettent d'identifier de nouveaux partenaires de YAP et TAZ (Figure 41).

3) Les cibles transcriptionnelles de YAP et TAZ

Plusieurs gènes cibles directs du complexe YAP/TAZ-TEAD et YKI/SD ont été identifiés dans les cellules de mammifères (Zhao et al., 2008)(Lai et al., 2011) et chez la drosophile (Zhang et al., 2008)(Wu et al., 2008)(Neto-Silva, de Beco, & Johnston, 2010)(Ziosi et al., 2010). L'ensemble de ces gènes cibles peuvent se répartir en deux groupes:

Les gènes cibles agissant de façon autonome cellulaire pour activer la croissance. Chez la drosophile, il s'agit des gènes impliqués dans la croissance cellulaire (*d-Myc*, *bantam*), la progression du cycle cellulaire (*cycline B*, *cycline D*, *cycline E*, *E2F1*) et les inhibiteurs de l'apoptose (*diap1*, *cIap1*). Chez les mammifères, ce groupe comprend principalement les gènes *Ctgf* (Connective Tissue Growth Factor) et *Cyr61* (CYstein-Rich angiogenic inducer 61 ou CCN1). Ces deux protéines appartiennent à la même famille des CCN (*Cyr61*, *Ctgf*, *Nov*) codant pour des protéines associées à la matrice extracellulaire et à la membrane plasmique. Ces protéines sont impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la survie, l'adhésion ou encore la migration. YAP et TAZ induisent également l'expression d'autres gènes cibles tels que la *Survivine/birc5* (Baculoviral IAP Repeat Containing 5), un inhibiteur de l'apoptose de la famille des IAPs ou encore l'*Ankrd1* (Ankyrin repeat domain-containing protein 1)(Zhao et al., 2008). Plus récemment, le gène codant pour le récepteur à activité tyrosine kinase de la famille des TAM (Tyro3-Axl-Mer) AXL a été décrit comme étant une cible directe de YAP (Xu et al., 2011). De façon similaire à YAP, la surexpression de cette protéine a été impliquée dans le développement et l'agressivité de nombreux cancers en activant la survie des cellules tumorales, leur prolifération ainsi que leur migration.

Le second groupe correspond aux gènes cibles agissant de façon non autonome cellulaire, codant pour des ligands d'autres voies de signalisation comme la voie Wnt, EGF, Hedgehog ou Notch. Chez la drosophile, le ligand de la voie Wnt, *Wg* est régulé par la voie de signalisation Hippo dans les ailes proximales où il joue un rôle majeur dans le contrôle de la croissance (Cho et al., 2006)(Cho & Irvine, 2004). Le ligand de la voie Notch, *Ser*, ou celui de la voie EGF, *Vein* peuvent aussi être régulés par la voie Hippo dans certains contextes (Cho et al., 2006)(Mao et al., 2006)(Zhang et al., 2009). Récemment, les études réalisées chez les mammifères ont aussi mis en évidence l'existence de gènes cibles agissant de façon non autonome cellulaire par la découverte que YAP était capable de transformer des cellules épithéliales mammaires en régulant positivement l'expression du ligand de l'EGFR, l'*amphireguline* (Zhang et al., 2009).

Enfin, comme c'est souvent le cas dans les voies de signalisation, la voie Hippo régule aussi l'expression de facteurs impliqués dans son propre contrôle, formant ainsi des boucles de rétro-régulation négative limitant l'effet d'une activation. C'est par exemple le cas des gènes *Ex*, *Kibra* et *Crb* régulés par YKI qui active la cascade de kinase et donc qui réprime la transcription des gènes cibles de la voie (Genevet et al., 2010)(Hamaratoglu et al., 2006)(Genevet et al., 2009)(Pan, 2010b). Les effets de YKI/YAP/TAZ sur la croissance cellulaire *in vivo* sont donc la conséquence d'une combinaison d'activation de gènes cibles agissant de façon cellulaire autonome et/ou non autonome et de manière différente selon les tissus.

4. INTERACTIONS ENTRE LA VOIE HIPPO ET LES AUTRES VOIES DE SIGNALISATION

L'étude des différentes voies de signalisation de façon indépendante est souvent le point de départ d'un projet qui aboutit de façon inévitable à l'étude des interactions de cette voie avec les autres signalisations connues. Bien que souvent très complexe, cette étude est indispensable dans le but de comprendre leur fonctionnement aussi bien au cours du développement qu'au sein d'un contexte pathologique. Concernant la voie de signalisation Hippo, les données de la littérature semblent montrer que les effecteurs de la voie YAP/TAZ possèdent de nombreuses interactions avec les voies TGF-β/SMAD, Wnt/β-caténine et Hedgehog.

1) Interaction entre les voies Hippo et TGF-β

Ces dernières années, de nombreuses études ont commencé à mettre en lumière l'interconnexion existante entre les voies de signalisation Hippo et celle du TGF-β/SMAD (Mauviel et al., 2012). La première mis en évidence de cette interaction a été réalisée grâce à une expérience de double hybride menée chez la levure dans le but d'identifier des partenaires de SMAD7 (Ferrigno et al., 2002). YAP lie spécifiquement la protéine SMAD7 puisqu'il n'interagit pas avec l'autre I-Smad, SMAD6. Cette interaction est possible grâce au motif PY de la protéine SMAD, suggérant l'implication du domaine WW de YAP. De plus, YAP a été montré comme jouant

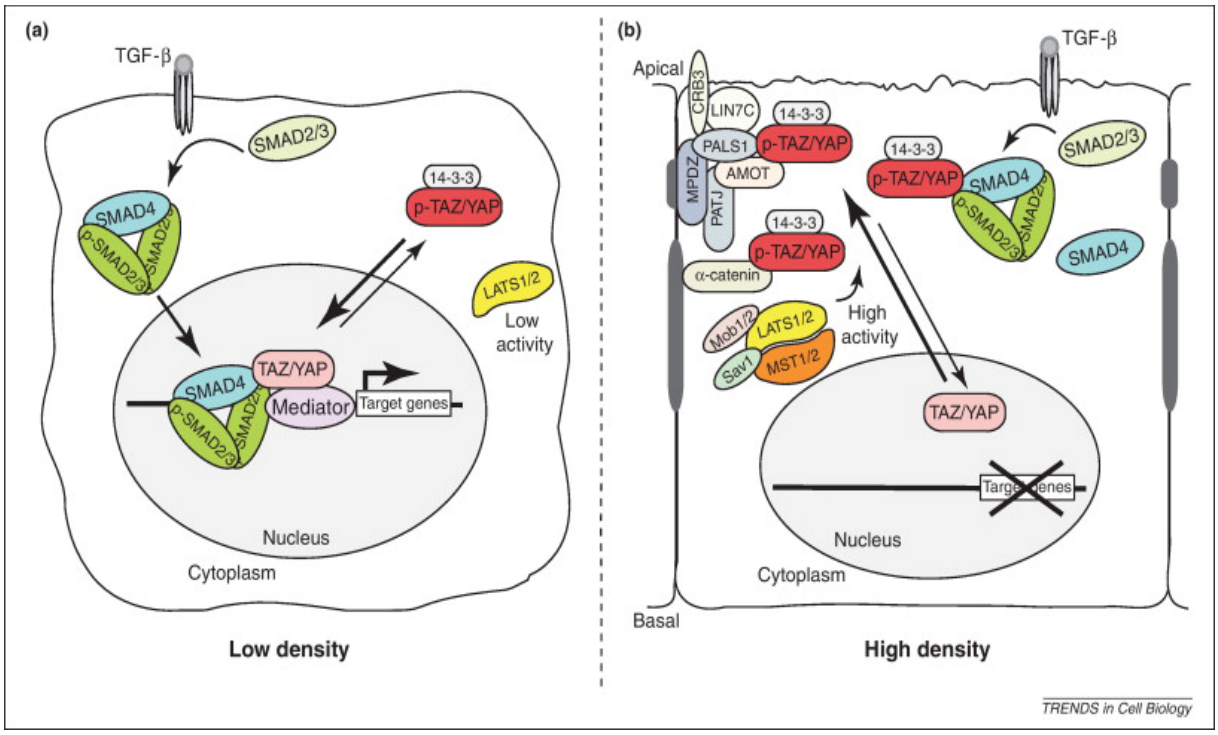


Figure 42: Schéma représentatif du modèle de fonctionnement de TAZ/YAP dans la voie TGF-β /SMAD. (**a**) A une densité cellulaire faible, les kinases de la voie Hippo sont inactives permettant une accumulation de TAZ/YAP dans le noyau. Suite à une activation de la voie des TGF-β, le complexe R-SMAD (Smad se liant aux récepteurs, SMAD2/3)-SMAD4 transloque dans le noyau où il interagit avec TAZ et YAP. Cette fixation retient le complexe dans le noyau et facilite le recrutement des protéines clés de la machinerie transcriptionnelle incluant le complexe Mediator/ARC. (**b**) Lorsque la densité cellulaire est plus importante, les différentes régulations de la voie Hippo se mettent en place afin d'activer la cascade de kinases. Cette activation entraîne la phosphorylation et la séquestration de TAZ/YAP dans le cytoplasme où les deux effecteurs de la voie Hippo peuvent lier les complexes SMAD2/3/4. Cette liaison cytoplasmique inhibe ainsi l'activation de la transcription des gènes cibles de la voie des TGF-β. D'après (Varelas & Wrana, 2012).

un rôle dans le recrutement de SMAD7 au niveau du récepteurβRI (TGF -β Receptor I) et augmentant ainsi son rôle d'inhibiteur (Ferrigno et al., 2002). Plus récemment, une deuxième étude a montré l'existence d'une interaction entre TAZ et SMAD2/3 dans des cellules de mammifères (Barrios-Rodiles et al., 2005). L'étude de cette interaction montre en fait que TAZ lie les hétérodimères SMAD2/3/4 en réponse à une stimulation par le TGF-β et est ensuite recruté dans le noyau au niveau des éléments de réponse au TGF-β (Figure 42)(Varelas et al., 2008). La liaison entre TAZ et SMAD2/3/4 active donc la transcription des gènes cibles de la voie du TGF-β comme *Smad7* et *pai-1*. La perte de fonction de TAZ réduit la transcription des gènes cibles de la voie du TGF-β mais n'altère pas la phosphorylation des SMAD2/3 par le TβRI ni la formation des complexes SMAD2/3/4. TAZ régule donc la voie des TGF-β en aval de la formation de ces complexes (Varelas et al., 2008). Cette même étude a aussi montré qu'un autre partenaire de SMAD2/3, la protéine ARC105, membre du complexe Mediator/ARC, pouvait se lier à TAZ (Figure 42). La surexpression de TAZ et ARC105 entraîne une augmentation de la localisation nucléaire de ces deux protéines ainsi qu'une colocalisation avec les protéines SMAD2/3/4 et la Tri-methyl-K4-Histone H3, marqueur d'une transcription génique active. TAZ semble donc réguler la transcription des gènes cibles de la voie du TGF-β en jouant sur le recrutement des protéines SMADs dans le noyau au niveau des éléments de réponse du TGF-β. La protéine YAP interagit également avec les protéines SMADs en se liant aux SMAD2/3. D'autres données montrent également que YAP/TAZ régulent aussi la localisation subcellulaire des protéines SMADs. En l'absence de TAZ, le complexe SMAD2/3/4 n'est plus capable de s'accumuler dans le noyau suite à une activation de la voie par le TGF-β (Varelas et al., 2008). YAP semble avoir un rôle similaire dans cette régulation (Varelas et al., 2010). Ce deuxième niveau de régulation laisse imaginer qu'en présence d'une forte densité cellulaire, la voie Hippo est activée, les protéines YAP et TAZ phosphorylées peuvent interagir et séquestrer les complexes SMADs dans le cytoplasme, aboutissant à l'inhibition de la voie de signalisation des TGF-β (Figure 42). Des expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* appuient cette hypothèse en montrant que la localisation de YAP/TAZ mime celle des SMADs. Par exemple, une perte de fonction des gènes *Lats1/2* aboutit à une localisation nucléaire de YAP/TAZ suivie par une translocation nucléaire des protéines SMADs et d'une activation des gènes cibles de la voie TGF-β (Varelas et al., 2010). Enfin, une étude a montré que le complexe YAP/TAZ/SMAD2/3/4 peut aussi avoir une activité répressive dans certains contextes. Dans le but d'identifier des protéines capables de se lier à la région promotrice du gène *Nanog* au sein de cellules souches embryonnaires humaines, une équipe a identifié un complexe protéique contenant les facteurs YAP, TAZ, OCT4, SMAD2/3 ainsi que plusieurs membres de la famille TEAD (Beyer et al., 2013)(Mullen, 2014). Alors que la voie de signalisation du TGF-β est à la fois nécessaire dans la

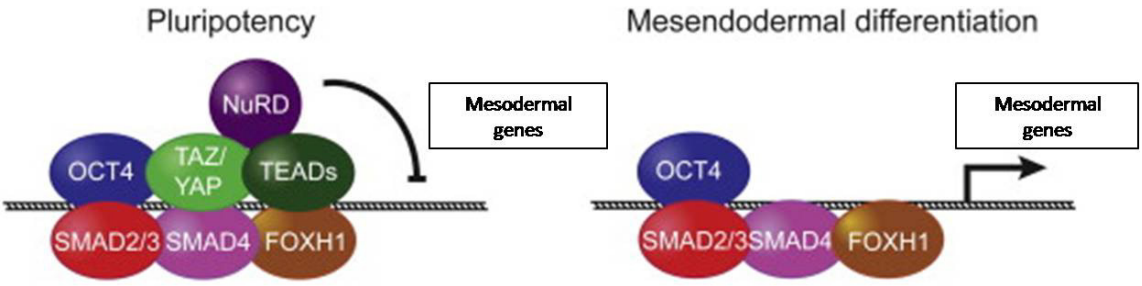


Figure 43: Modèle d'interaction de YAP/TAZ avec le complexe SMAD2/3/4 dans le contrôle de la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines. La région promotrice d'un ensemble de gènes nécessaires à la différenciation mésodermique est fixée par un complexe incluant les protéines YAP/TAZ/TEAD/OCT4/SMAD2/3/4/FOXH1/NuRD. La transcription de ces gènes est inhibée lorsque les protéines YAP/TAZ et les facteurs TEADs sont recrutés au sein de ce complexe (**à gauche**). Leur présence permet en effet de recruter le complexe NuRD responsable de cette répression. En condition de différenciation, l'absence de YAP/TAZ/TEADs permet de libérer le complexe NuRD et ainsi d'activer la transcription des gènes mésodermiques (à **droite**). D'après (Mullen, 2014).

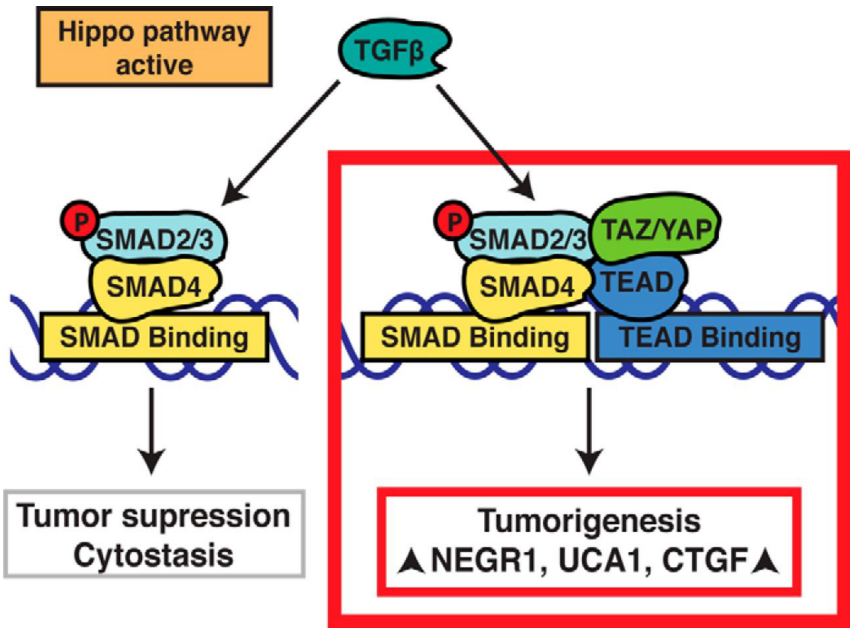


Figure 44: Modèle de l'interaction de YAP/TAZ/TEAD et des facteurs SMADs dans les cellules du cancer du sein. L'augmentation de l'expression nucléaire des protéines YAP/TAZ, résultant d'une perturbation de la régulation en amont de la voie Hippo, est responsable de la modification de la réponse induite par le TFG-β. Certains gènes régulés positivement par le complexe YAP/TAZ/TEAD/SMAD comme les gènes *Negr1* ou *Uca1* sont nécessaires dans le maintien de l'activité tumorale dans les métastases du cancer du sein. D'après (Hiemer et al., 2014).

maintenance de la pluripotence de ces cellules et dans leur différenciation en dérivés mésodermiques, les auteurs montrent que l'inhibition de YAP et TAZ ou des quatre membres de la famille des facteurs de transcription TEADs au sein de ce complexe est suffisant pour activer la transcription des gènes clés de la différenciation mésodermique. Cette activité inhibitrice de YAP/TAZ/TEAD semble faire intervenir le recrutement de plusieurs composants du complexe NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase) (Figure 43). Ainsi, les effecteurs de la voie Hippo semblent donc nécessaires à la voie du TGF-β pour inhiber la transcription des gènes mésodermiques. La protéine YAP intervient aussi dans la régulation de la voie des BMPs (Alarcón et al., 2009). En effet, YAP lie les protéines SMAD1/5/8 et cette interaction est essentielle à l'activation de la transcription des gènes cibles de la voie BMP comme *Smad7* et *Id1* (Inhibitor of DNA binding 1)(Alarcón et al., 2009). Les protéines R-Smads peuvent être phosphorylées par d'autres protéines kinases intracellulaires que le TR-β-I dans leur région charnière centrale. Cette phosphorylation est un facteur essentiel pouvant induire l'ubiquitynilation des protéines Smads. Cette étude a notamment montré que les kinases CDK8/9 associées au complexe Mediator/ARC étaient impliquées dans la phosphorylation du domaine charnière de SMAD1 et que cette phosphorylation stimule l'interaction entre SMAD1 et le domaine WW de YAP (Alarcón et al., 2009). Enfin, plus récemment, TAZ et YAP ont également été décrits comme étant nécessaire pour l'induction et le maintien des phénotypes de tumorigenèse induit par le TGF-β dans des cellules de cancer du sein (Hiemer et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent une interaction nucléaire de YAP/TAZ, TEAD et SMAD2/3/4 , suggérant une régulation transcriptionnelle commune de ces facteurs. En accord avec les données précédentes, une expérience de "microarray" montre que le complexe YAP/TAZ/TEAD semble pouvoir réguler positivement mais aussi négativement certains de ses gènes cibles et qu'une partie de ces gènes, caractérisés comme étant responsables des phénotypes métastatiques dans les cancers du sein, sont contrôlés de façon similaire par le complexe YAP/TAZ/TEAD et la voie du TGF-β. Ainsi, les auteurs proposent un modèle dans lequel l'interaction du complexe SMAD2/3/4 avec le complexe YAP/TAZ/TEAD dans le noyau pourrait être responsable du phénotype de tumorigenèse induit par la voie du TGF-β dans les cancers du sein (Figure 44). Cette dernière étude révèle donc un nouveau contexte dans lequel les voies de signalisation Hippo et TGF-β interagissent.

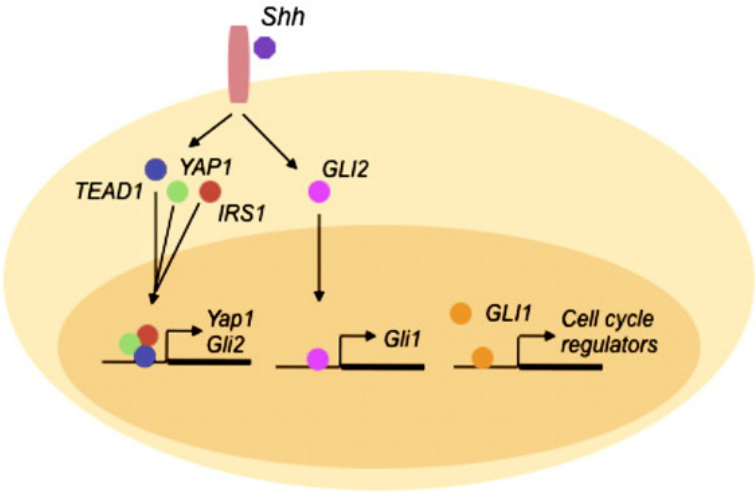


Figure 45: Modèle d'interaction hypothétique entre les voies Hippo et Hedgehog dans les médullobastomes. La voie de signalisation Hh active l'expression de *Yap*, stabilise la protéine YAP et induit sa localisation nucléaire grâce à sa fixation avec la protéine IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1). Les protéines TEAD1 et IRS1 sont également stabilisées par la voie Hh. Ainsi, le tri-complexe YAP-TEAD1-IRS1 nucléaire active la transcription de gènes comme *Gli2.* Ce dernier peut alors à son tour transloquer dans le noyau et réguler positivement la transcription de *Gli1* et des autres médiateur de la voie Hh. D'après (Fernandez-L et al., 2009).

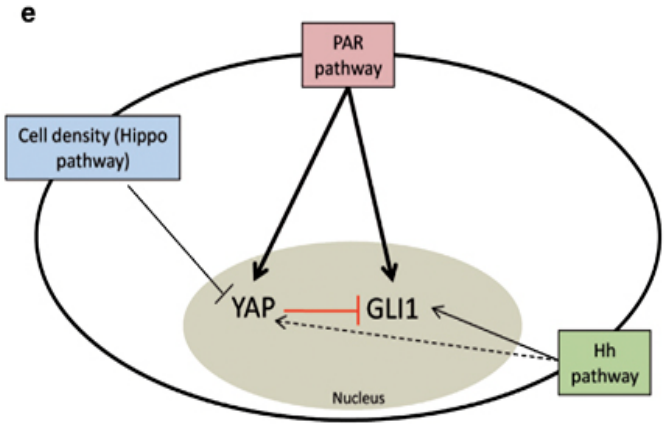


Figure 46: Modèle de l'interaction entre les voies Hippo et Hedgehog. Ce modèle décrit à la fois un impact négatif de YAP sur la voie Hh/GLI et une régulation positive de la voie Hh sur YAP. La protéine YAP peut directement interagir et inhiber GLI1 afin d'inhiber la transcription des gènes cibles de la voie Hh. Dans l'autre sens, l'activation de la voie Hh régule positivement l'activité de YAP à travers plusieurs mécanismes post-transcriptionnels aboutissant à une stabilisation de la protéine. Dans ce modèle, le récepteur PAR (Protease Activated Receptor) semble pouvoir réguler positivement à la fois YAP et GLI1(Tariki et al., 2014).

2) Interaction entre les voies Hippo et Hedgehog

Pour le moment, encore peu de données ont été publiées dans la littérature concernant les interactions entre les voies de signalisation Hippo et Hedgehog. Une première étude a observé une surexpression spécifique de YAP et TEAD dans un type particulier de médulloblastome induit par l'activation constitutive de la voie Hedgehog (Fernandez-L et al., 2009). Dans ce contexte, la voie Hedgehog semble activer YAP dans les précurseurs à l'origine de la formation du médulloblastome ayant été décrits comme possédant des propriétés de cellules souches cancéreuses. L'activation de YAP observée par les auteurs correspond à une augmentation de l'expression de son ARNm, une stabilisation ainsi qu'une accumulation de la protéine dans le noyau (Figure 45). Les mécanismes responsables de ces différents effets ne sont pas connus. Dans cette étude, les auteurs démontrent également une régulation inversée puisque le complexe YAP/TEAD induit directement l'expression de *Gli2.* Des sites de liaison de TEAD1 ont été identifiés dans la région promotrice de ce gène (Figure 45)(Fernandez-L et al., 2009). Dans un autre contexte, une deuxième étude a permis de mettre en évidence une régulation de la voie de signalisation Hedgehog par YAP dans la différenciation neuronale. L'expression de YAP semble activer l'activité de la voie Hedgehog dans des cellules soumises à des conditions de culture favorisant leur différenciation neuronale. Alors que la surexpression de YAP empêche la différenciation des cellules, la perte de fonction simultanée de *Gli2* sauve ce phénotype, suggérant que la voie Hedgehog agit en aval de YAP dans ce processus (Lin et al., 2012). Dans cette étude, l'implication d'autres voies de signalisation comme les voies Wnt et Notch ne semblent pas nécessaire. Plus récemment, une équipe a démontré l'existence d'une autre interaction entre les voies Hippo et Hh dans les cellules souches folliculaires de l'ovaire chez la drosophile. Dans ce modèle, la voie Hh active la transcription de *Yki* qui semble jouer un rôle essentiel dans la maintenance et la prolifération de cette population de cellules (Jianhua Huang & Kalderon, 2014). Enfin, étant donné que les voies Hippo et Hh sont toutes les deux connues dans la littérature pour être modulées en fonction de la densité cellulaire, une équipe a étudié leur potentielle interaction dans ce contexte. Ces travaux ont ainsi mis en évidence un impact antagoniste de la voie Hippo sur Hh et au contraire, une régulation positive de la voie Hh sur Hippo (Figure 46)(Tariki et al., 2014). En effet, la surexpression de *Yap* en cas de forte densité cellulaire bloque la transcription des gènes cibles de la voie Hh alors que l'inhibition de *Yap* dans des cultures confluentes augmente au contraire son activité. Les auteurs proposent alors un modèle selon lequel YAP pourrait se fixer et réguler négativement l'activité du facteur de

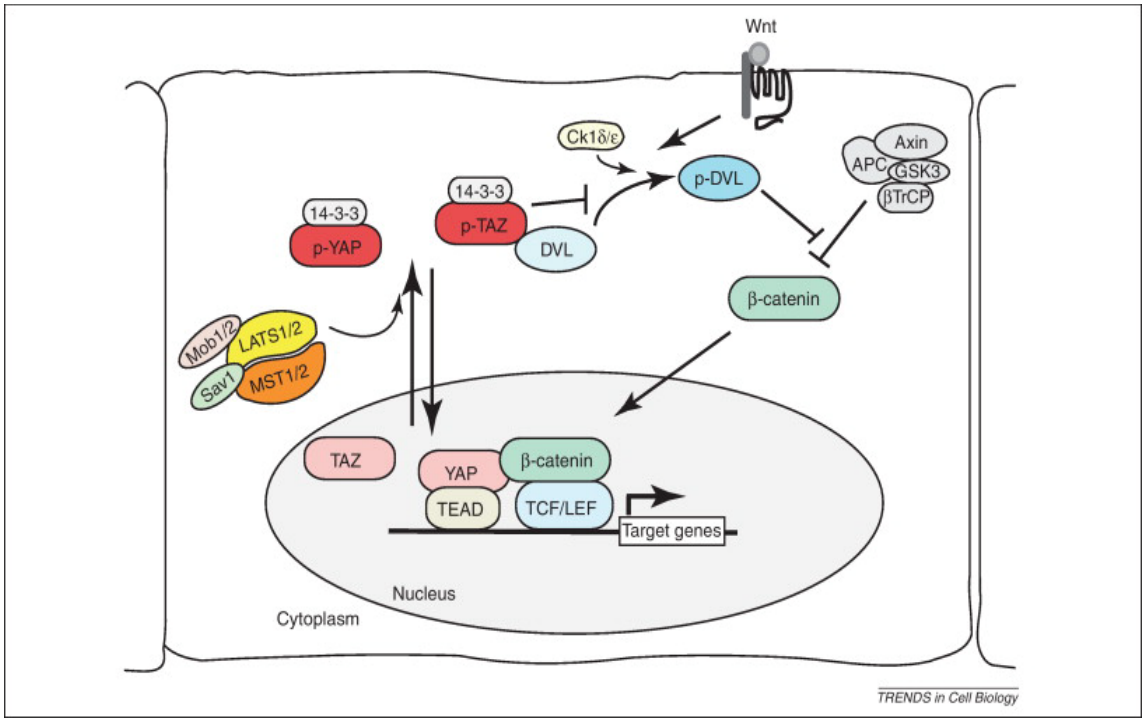


Figure 47: Interaction entre les voies de signalisation Wnt et Hippo. L'activation de la cascade Hippo provoque la phosphorylation et la localisation cytoplasmique de YAP/TAZ. Dans ce cas, p TAZ fixe la protéine DVL et empêche ainsi sa phosphorylation par la kinase CK1 lors de l'activation de la voie Wnt. En conséquence, la β-caténine reste séquestrée dans le cytoplasme, inhibant ainsi l'expression des gènes cibles de la voie Wnt. Le complexe YAP/TEAD peut également agir de façon coopérative avec la β-caténine dans le noyau afin d'induire la transcription de certains gènes cibles. D'après (Varelas & Wrana, 2012).

transcription GLI1 inhibant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie Hh. A l'inverse, la voie Hh stabilise la protéine YAP suggérant l'existence d'une boucle de régulation négative.

3) Interaction entre les voies Hippo et Wnt

Les voies de signalisation Hippo et Wnt sont toutes les deux essentielles dans le développement, la croissance et l'homéostasie tissulaire. Ces deux voies possèdent de nombreux points communs sur le plan mécanistique et leur activation est observée dans des contextes très similaires. Ainsi, depuis quelques années, des travaux ont commencé à mettre en évidence des régulations réciproques entre ces deux voies.

3.1 Régulation de la voie de signalisation Wnt par la voie Hippo

La voie de signalisation Hippo interagit avec la voie Wnt à plusieurs niveaux. L'un des premiers points d'interaction identifié a été l'interaction entre l'effecteur de la voie Hippo, TAZ et DVL (Dishevelled) (Varelas, Miller, et al., 2010). En effet, la protéine TAZ lie le motif PY de DVL grâce à son domaine WW et le domaine PDZ de DVL fixe également le motif de liaison PDZ de TAZ. Cette dernière interaction empêche la fixation de la kinase CK1, la phosphorylation de DVL et donc, la dissociation du complexe de destruction de la β-caténine. L'inhibition de l'expression de *Taz* par l'utilisation de siRNA augmente l'activité transcriptionnelle de la la β-caténine. TAZ agit donc comme un régulateur négatif de la voie Wnt (Figure 47). La phosphorylation de TAZ par les kinases Lats1/2 de la voie Hippo est nécessaire à cette interaction. En effet, on obtient un phénotype similaire à celui de la perte de fonction de *Taz* lorsqu'on utilise des siRNA contre les kinases LATS1/2 ou MST1/2. Cette étude montre donc que la phosphorylation de TAZ aboutissant à sa localisation cytoplasmique ne sert pas uniquement à l'inhibition de son activité nucléaire. L'impact de l'inhibition de TAZ sur la voie Wnt a aussi été observé dans les souris KO pour *Taz* qui développent des kystes rénaux sévères, très similaires à la polykystose rénale obtenu après une hyperactivation de la voie Wnt (Varelas, Miller, et al., 2010). Une forte localisation nucléaire de la β-caténine a été observée au sein de ces kystes rénaux. Un an plus tard, deux équipes ont montré que la voie Hippo régulait la transcription des gènes cibles de Wnt en inhibant l'activité de la β-caténine durant le développement cardiaque (Heallen et al., 2011) et l'intestin (Zhou et al., 2011). Dans la première étude, les auteurs ont utilisé des souris KO *Sav*, la protéine adaptatrice nécessaire à la cascade de kinases de la voie Hippo. Une

perte de fonction *Sav* dans le muscle cardiaque aboutit à une forte activation de la prolifération des cardiomyocytes associée à une accumulation nucléaire de YAP. Une analyse à grande échelle utilisant des "microarrays" montre une surexpression de plusieurs gènes cibles de la voie Wnt dans les tissus cardiaques après une délétion de *Sav*. Cet effet est associé à une augmentation de l'expression de la β -caténine 4 fois supérieur par rapport au tissu contrôle (Heallen et al., 2011). La même année, une seconde équipe montre que la délétion des kinases MST1/2 provoque également une augmentation de l'activité de la β -caténine dans le tissu intestinal (Zhou et al., 2011). Enfin, les protéines YAP et TAZ phosphorylées peuvent directement lier la β -caténine dans les cellules HEK 293T en culture aboutissant à sa séquestration cytoplasmique (Imajo, Miyatake et al., 2012). L'utilisation d'une forme tronquée de la β-caténine, incapable d'interagir avec YAP garde sa capacité de transcrire efficacement les gènes cibles de la voie Wnt. Bien que les mécanismes ne sont pas encore bien compris, l'ensemble de ces résultats suggèrent que la voie de signalisation Hippo est un régulateur négatif de la voie Wnt/β-caténine. Etant donné que la forme phosphorylée de YAP réduit fortement l'activité transcriptionnelle de laβ -caténine par un mécanisme de séquestration, on peut se demander si au contraire, une augmentation de la forme nucléaire de YAP pourrait faciliter la translocation de la β-caténine dans le noyau. Pour le moment, aucune donnée appuyant cette hypothèse n'a encore été publiée. Malgré tout, l'interaction entre YAP et la β -caténine dans le noyau est aussi possible et a déjà été observée dans les tissus cardiaques chez la souris. Dans ce cas, les deux facteurs agissent de façon synergique pour activer l'expression des gènes cibles de la voie Wnt, *Sox2* et *Snai2* (Heallen et al., 2011).

3.2 Régulation de la voie de signalisation Hippo par la voie Wnt

En parallèle des travaux montrant que la voie Hippo contrôle la voie de signalisation Wnt, d'autres études récentes commencent à mettre en évidence une régulation réciproque. Chez la drosophile, le ligand Wnt, Wg (*Wingless*), le complexe Fat-Dachsous et la voie Hippo interagissent dans le contrôle du développement des ailes. Les cellules de bordures dans les disques imaginaux d'ailes chez la mouche expriment *Wg* et *Vg* (*Vestigial*), un facteur de transcription spécifiquement exprimé dans les cellules des ailes. Les cellules de bordure émettent un signal impliquant le facteur Wg dans le but de recruter des cellules des tissus avoisinants et de forcer leur différenciation en cellule d'aile. Dans ce contexte, le complexe Fat-Dachsous ainsi que la voie de signalisation Hippo semble impliqués dans la régulation de ce signal (Zecca & Struhl, 2010). Une fois les cellules recrutées, la différenciation des cellules est

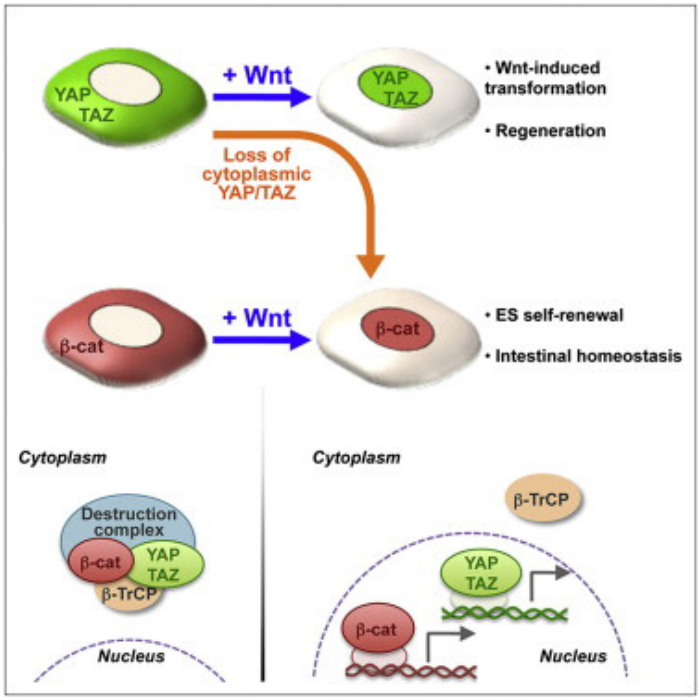


Figure 48: Modèle d'intégration de YAP/TAZ au sein de la voie de signalisation Wnt. L'activation de la voie Wnt induit la stabilisation de YAP/TAZ ainsi que leur translocation nucléaire (en haut).YAP/TAZ semble faire partie du complexe de destruction de la β-caténine dans la voie Wnt. La présence de YAP/TAZ au sein de ce complexe semble nécessaire au recrutement de la β-TrCP. L'activation de la voie Wnt permet de libérer YAP/TAZ et ainsi de provoquer leur translocation nucléaire. D'après (Azzolin et al., 2014).

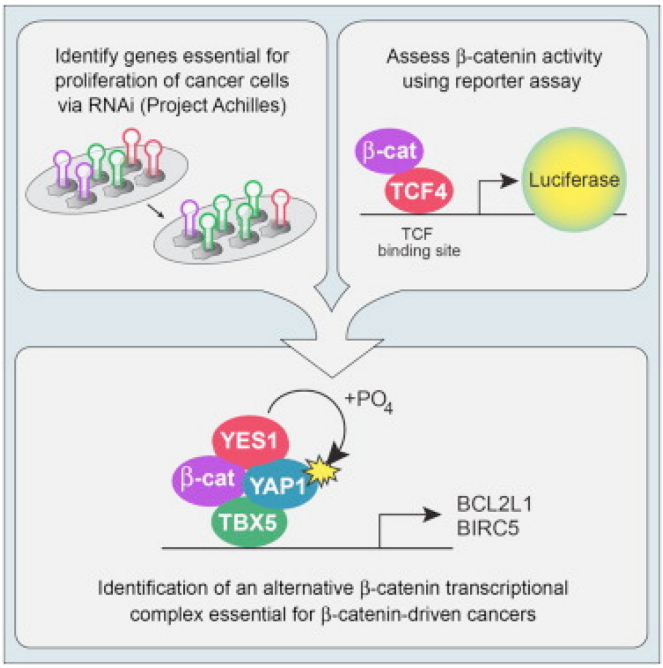


Figure 49: Le complexe β-caténine-YAP-TBX5 est essentiel au maintien de certaines lignées cellulaires cancéreuses. YAP, TBX5 et la β-caténine forment un complexe essentiel à la survie et à la prolifération de certaines lignées cancéreuses montrant une forte activité de laβ -caténine. Dans ce modèle, la phosphorylation de YAP par la kinase YES permet de recruter ce complexe sur les promoteurs de gènes apoptotiques comme *Birc5* ou *Bcl2l1*. D'après (Rosenbluh et al., 2012).

due en partie au facteur DACHS. Ce dernier inhibe la cascade de kinases Hippo et permet l'accumulation nucléaire de YKI. Le complexe YKI/SD active ensuite directement la transcription de *Vg*. Les facteurs Wg, Fat-Dachsous et la voie Hippo contrôle la croissance et la différenciation des cellules de l'aile chez la drosophile. Une relation similaire entre ces facteurs n'a pas encore été mise en évidence chez les mammifères. La glycoprotéine de surface CD44 connecte aussi les deux voies de signalisation. CD44 est un gène cible direct du complexe β-caténine/TCF (Wielenga et al., 1999) et son interaction avec Merlin a été démontrée (Morrison et al., 2001). CD44 fixe l'acide hyaluronique (HA) exprimé dans la matrice extracellulaire et cette interaction entraîne l'activation d'une cascade de signalisation qui limite la croissance tissulaire. La fixation de l'HA sur son récepteur CD44 recrute et active la protéine MER. Dans ce cadre, la surexpression de CD44 par la voie Wnt pourrait enclencher l'activation de la voie Hippo dans la restriction de la croissance. Plus récemment, une étude a identifié un site de fixation du complexe β-caténine/TCF4 au niveau du premier intron du gène *Yap* dans des modèles de cancers du côlon, montrant que la voie Wnt contrôle l'expression de *Yap* dans ces cellules (Konsavage et al., 2012). YAP semble donc être une cible directe de la voie Wnt. Enfin, deux équipes ont proposé de nouveaux modèles pouvant expliquer les résultats contradictoires observés dans la mise en évidence de l'interaction entre les voies Wnt et Hippo (Tsai, Hoverter, & Waterman, 2012). Tout d'abord, l'équipe de S. Piccolo propose un modèle dans lequel les deux effecteurs de la voie Hippo YAP et TAZ pourraient faire partie intégrante du complexe de destruction de la β-caténine (Azzolin et al., 2012)(Azzolin et al., 2014). Dans ces travaux, les auteurs montrent en effet qu'en absence de stimulation par Wnt, YAP/TAZ fixent l'Axine, un des composants essentiels du complexe de dégradation de la β-caténine. Au contraire, l'activation de la voie Wnt ou la perte de fonction des composants du complexe provoque la libération de YAP/TAZ et ainsi leur translocation rapide dans le noyau. De plus, les auteurs montrent que la présence de YAP/TAZ au sein du complexe est essentiel au recrutement de la β-TrCP (β-Transducin repeat-containing protein) responsable de l'ubiquitinylation et donc de la dégradation de la β-caténine. Pour résumer, cette étude démontre un double rôle de YAP/TAZ à la fois inhibiteur en absence de stimulation de la voie Wnt et activateur en cas de destruction du complexe de dégradation de la β-caténine (Figure 48). Dans la seconde étude, les auteurs ont utilisé les données d'un crible siARN à grande échelle visant à identifier des gènes essentiels pour la prolifération et la survie cellulaire d'une centaine de lignées cancéreuses (Rosenbluh et al., 2012). Sur 85 de ces lignées, les auteurs ont ensuite mesuré l'activité de la β-caténine grâce à une construction rapportrice et ont sélectionné les gènes nécessaires au maintien des 19 lignées ayant une forte activité de la β-caténine (Figure 49). Parmi ces gènes, les auteurs ont identifié *Yap1*, *Yes* (une kinase Src-like) et un gène codant un facteur de transcription à boite T, *Tbx5*.

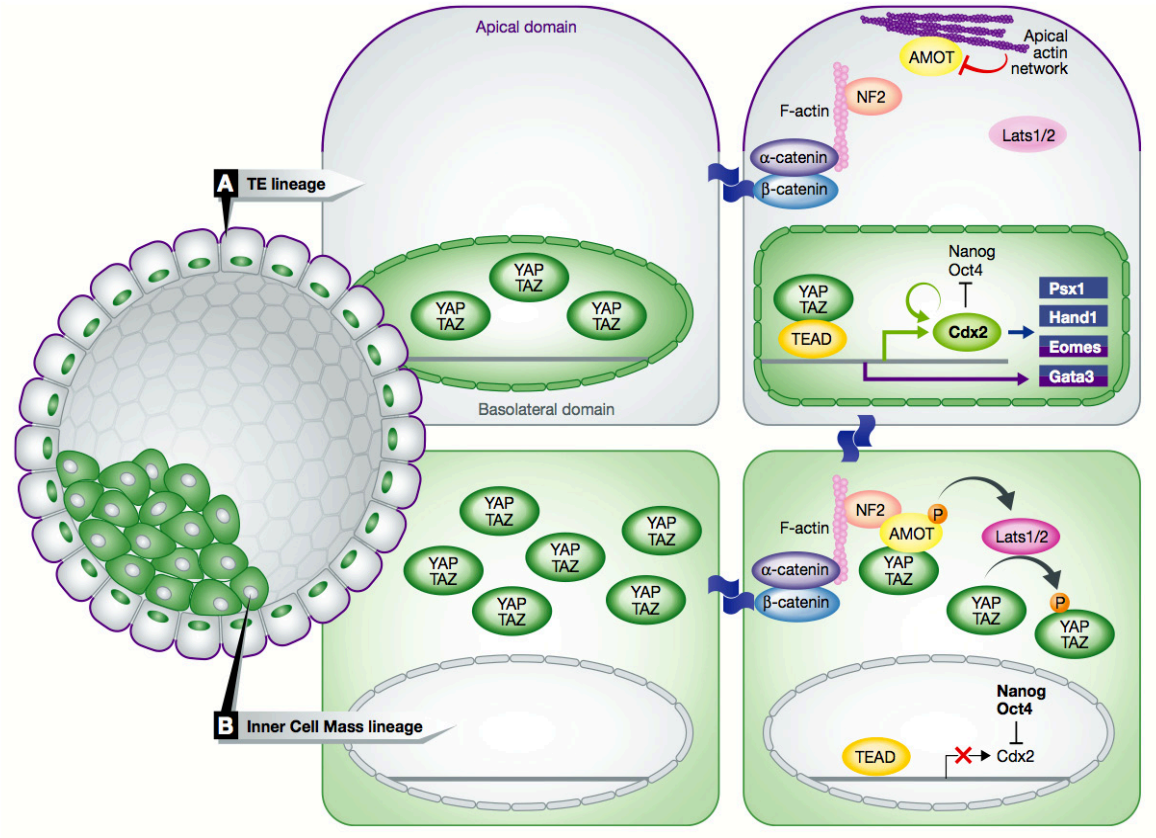


Figure 50: Localisation dynamique de YAP/TAZ au stade blastocyste chez la souris. Au cours de l'étape de pré-implantation, les futures cellules du trophectoderme (TE) forme une couche externe qui enveloppe les autres cellules de la masse cellulaire interne. Les cellules du TE localisées à la surface de l'embryon possèdent une polarité bien définie contrairement aux cellules de la masse cellulaire interne. (**A**) Dans les cellules du TE, la localisation nucléaire de YAP/TAZ et TEAD4 permet d'activer la transcription de gènes nécessaires à leur différenciation. (**B**) Dans les cellules internes, les contacts cellulaires modifient l'activité de la voie Hippo aboutissant à une localisation cytoplasmique de YAP/TAZ. D'après (Mo et al., 2014).

Un nouveau tri-complexe regroupant la β-caténine, YAP et TBX5 a ainsi été mis en évidence dans l'activation de gènes de survie comme *Bcl2l1* ou *Birc5* essentiel au maintien de certaines lignées cellulaires cancéreuses présentant une activation de la β-caténine (Figure 49).

5. ROLES DE LA VOIE HIPPO

Durant ces 10 dernières années, la voie de signalisation Hippo a été décrite comme un régulateur essentiel de la croissance tissulaire et de la taille des organes. Plus récemment, de nombreuses études ont commencé à mettre en lumière plusieurs autres fonctions de cette signalisation, en particulier dues aux deux effecteurs de la voie, YAP et TAZ. En effet, ces deux facteurs sont impliqués dans la régulation de processus clés durant le développement embryonnaire mais aussi au cours du maintien de l'homéostasie tissulaire ou encore dans les mécanismes de régénération.

1) Au cours du développement

La voie de signalisation Hippo est souvent caractérisée de régulateur essentiel du développement embryonnaire. La réalisation de modèles de souris KO pour un grand nombre de composants de la voie Hippo (*Mer*, *WW45*, *Mst1/2*, *Lats1/2*, *Yap*, *Taz*) provoque une létalité embryonnaire ou périnatale montrant le rôle essentiel de cette voie dans le développement embryonnaire précoce chez les mammifères. En particulier, YAP/TAZ jouent un rôle crucial dans les étapes du développement précoce. L'inactivation de YAP entraîne une mort embryonnaire à E8.5 accompagnée de défauts de vascularisation du sac vitellin, de l'attachement chorioallantoïque et de l'élongation embryonnaire (Morin-kensicki et al., 2006). L'inactivation de TAZ provoque une létalité partielle des embryons à la naissance et les survivants présentent des emphysèmes pulmonaires ainsi que des maladies rénales (Hossain et al., 2007)(Tian et al., 2007)(Makita et al., 2008). Enfin, la double inactivation de YAP et TAZ arrête le développement avant l'implantation de l'embryon (Nishioka et al., 2009). Ce phénotype est expliqué par le rôle des deux effecteurs de la voie de signalisation Hippo lors de l'engagement des cellules à devenir des cellules du trophectoderme ou des cellules de la masse cellulaire interne (ICM) avant le stade blastocyste (Nishioka et al., 2009)(Hirate et al., 2013)(Gumbiner & Kim, 2014)(Mo et al., 2014). Dès le stade 8 cellules, les cellules subissent un phénomène de "compaction" et forment

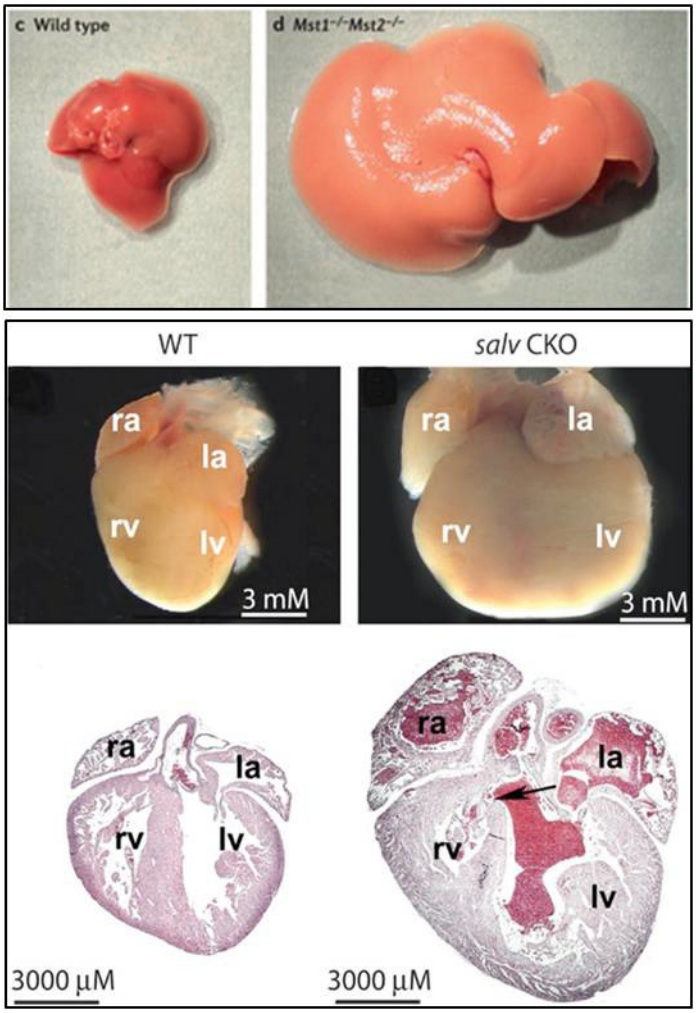


Figure 51: Rôle de la voie de signalisation Hippo dans la régulation de la croissance au cours du développement. (**En haut**) Comparaison de la taille d'un foie d'une souris sauvage à deux mois (à gauche) par rapport à celui d'une souris du même âge chez laquelle les kinases *Mst1/2* ont été inactivées. D'après (Johnson & Halder, 2014). (**En bas**) La délétion spécifique du gène *Sav* provoque un phénotype d'hypertrophie cardiaque. D'après (Wackerhage et al., 2014).

des jonctions serrées et adhérentes avec leurs cellules voisines tout en continuant leurs divisions. La compaction et donc la mise en place de la polarité n'est pas identique dans toutes les cellules et permet la séparation entre les deux lignages embryonnaires. Une récente étude a montré qu'au cours de cette étape, la localisation de YAP/TAZ était différente (Nishioka et al., 2009). Les cellules les plus externes et donc les moins compactées possèdent une expression des protéines YAP/TAZ majoritairement nucléaire. Ces cellules sont destinées à devenir des cellules du trophectoderme. Au contraire, les cellules les plus internes, futures cellules de l'ICM, expriment plus fortement YAP/TAZ dans le cytoplasme (Figure 50). Dans ce contexte, YAP/TAZ nucléaire contrôle l'activité du facteur de transcription TEAD4 pour activer l'expression des gènes spécifiquement exprimés dans le trophectoderme comme *Cdx2* et *Gata3* (Home et al., 2012)(Nishioka et al., 2009). Dans ce contexte, MER et les protéines AMOTs, deux composants intervenant en amont du cœur de la voie Hippo, facilite la phosphorylation de YAP par les kinases LATS1/2 durant la spécification des cellules de la masse cellulaire interne dans le développement précoce chez la souris (Cockburn et al., 2013)(Hirate et al., 2013). Etant donné les phénotypes sévères obtenus après l'inactivation de YAP et TAZ, les chercheurs ont utilisés d'autres modèles murins comme des souris KO *Mst1/2*, *Sav1* ou *Merlin* pour étudier le rôle de YAP/TAZ au cours du développement embryonnaire. Ces animaux montrent également des défauts embryonnaires sévères mais qui apparaissent plus tardivement (Lee et al., 2008)(Lu et al., 2010)(Oh et al., 2009)(Song et al., 2010)(McClatchey et al., 1997).

Au cours du développement embryonnaire plus tardif, plusieurs études suggèrent que la forme nucléaire de YAP/TAZ/YKI est essentielle pour la prolifération des cellules progénitrices dans une grande variété de modèles et qu'au contraire, la forme cytoplasmique des effecteurs de la voie est nécessaire au maintien de l'homéostasie tissulaire. Par exemple, la surexpression de YAP dans le foie chez la souris (Figure 51) ou dans le tube neural durant le développement chez le poulet provoque une expansion massive du nombre de progéniteurs en prolifération aux dépens des cellules différenciées (Camargo et al., 2007)(Cao, Pfaff, & Gage, 2008). Cet effet est dû à la capacité de YAP non seulement de promouvoir la progression des cellules dans le cycle cellulaire par l'induction de l'expression de cyclines, mais aussi d'inhiber la différenciation. De la même façon, la perte de fonction du gène *Sav* entraîne une augmentation de la population de progéniteurs et inhibe leur différenciation dans le développement et le renouvellement de la peau, de l'intestin et de l'épithélium pulmonaire (Lee et al., 2008). Plus récemment, d'autres travaux ont montré que la localisation de YAP était aussi essentielle au bon déroulement du développement du pancréas chez la souris. Les souris KO pour les kinases *Mst1/2* montrent en effet de sévères problèmes développementaux au niveau du pancréas corrélés avec une augmentation de l'expression nucléaire de YAP (Gao et al., 2014)(George, Day et al., 2012).

Enfin, plusieurs études ont mis en évidence le rôle essentiel de la voie Hippo et en particulier de YAP dans le développement cardiovasculaire chez la souris (Zhou, 2014). Des KO *Sav*, *Lats2* et *Mst1/2* spécifiques des tissus cardiaques montrent en effet une augmentation de la taille du cœur associée à une augmentation du nombre de cardiomyocytes en prolifération (Figure 51)(Heallen et al., 2011) alors que la délétion de *Yap* durant le développement tardif du cœur est létal due à un phénotype d'hypoplasie du myocarde (Xin et al., 2013)(Del Re et al., 2013).

2) Dans la régulation des cellules souches et des progéniteurs

La voie de signalisation Hippo a été initialement décrite comme jouant un rôle essentiel dans le maintien de la taille des organes au cours du développement. De plus en plus d'études commencent à démontrer le rôle de cette voie dans le maintien, l'auto-renouvellement et la division des cellules souches et des progéniteurs dans différents modèles (Tremblay & Camargo, 2012)(Hiemer & Varelas, 2013)(Zhao, Tumaneng, & Guan, 2011)(Huan Liu, Jiang, Chi, & Zhao, 2012)(Piccolo et al. 2014).

2.1 Les cellules souches embryonnaires et les cellules pluripotentes induites

Les cellules souches embryonnaires (ESCs) sont des cellules pluripotentes qui possèdent la capacité de s'auto-renouveler et de donner tous les types cellulaires d'un organisme adulte. Jusqu'en 2006 et la découverte faite par Shinya Yamanaka sur la reprogrammation des cellules somatiques en cellules pluripotentes, les ESCs représentait la seule source de cellules souches pluripotentes. Aujourd'hui, les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) représentent potentiellement une source cellulaire inépuisable présentant les mêmes capacités de différenciation et d'auto-renouvellement que les ESCs. Ces cellules ont été initialement obtenues grâce à l'activité de 4 facteurs de transcription essentiels, KLF4, c-MYC, OCT4 et SOX2 (Takahashi & Yamanaka, 2006). Concernant les cellules souches embryonnaires, un rôle essentiel de la voie de signalisation Hippo a été décrit dans ces cellules. Tout d'abord, l'inhibition de TAZ dans les cellules souches embryonnaires humaines provoque la perte des propriétés de pluripotence de ces cellules (Varelas et al., 2008). De la même façon, YAP est également essentiel au maintien des propriétés des ESCs murines et son inactivation est indispensable à leur différenciation (Lian et al., 2010)(Alarcón et al., 2009)(Tamm, Böwer, & Annerén, 2011). De plus, la surexpression de YAP permet d'augmenter fortement l'efficacité de reprogrammation des iPSs

à partir de fibroblastes embryonnaire de souris (Lian et al., 2010). Les deux effecteurs de la voie YAP/TAZ sont majoritairement nucléaires dans les cellules souches embryonnaires en culture suggérant que leur rôle dans le maintien des propriétés des cellules souches se joue au niveau transcriptionnel. Cette idée est également appuyée par le fait que la surexpression de la forme nucléaire de YAP a un effet encore plus important sur le maintien des propriétés de pluripotence, l'inhibition de la différenciation des ESCs et l'activation de l'efficacité de reprogrammation des iPSCs (Lian et al., 2010). La voie de signalisation Hippo interagit avec d'autres voies de signalisation connues comme jouant un rôle essentiel dans le maintien des propriétés des ESCs comme les voies TGF-β, BMP ou encore la voie LIF (Leukemia Inhibitor Factor) aussi bien *in vivo* qu'en culture (Varelas et al., 2008) (Varelas et al., 2010)(Alarcón et al., 2009)(Tamm et al., 2011)(Tremblay & Camargo, 2012). Enfin, le complexe YAP-TEAD lie et active la transcription de gènes essentiels aux propriétés des ESCs comme *Oct3/4, Sox2*, les cibles du complexe Polycomb, les cibles de la voie LIF et BMP ou encore *Nanog* (Lian et al., 2010)(Tamm et al., 2011). YAP, TAZ et TEAD semblent donc être des régulateurs clés dans le maintien de la pluripotence des ESCs et des IPs chez les mammifères. Cependant, une étude publiée cette année montre des résultats très surprenants et en totale contradiction avec les données de la littérature (Azzolin et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs utilisent un milieu de culture particulier supplémenté de deux inhibiteurs, des MEK et de la GSK3 afin de maintenir l'état "souche" des ESCs. L'enlèvement de l'inhibiteur de la GSK3 dans ce milieu provoque une perte des propriétés des ESCs et induit leur différenciation. Dans ce contexte, les auteurs montrent que l'inhibition de YAP et TAZ permet de sauver ce phénotype, suggérant que l'inactivation de ces deux facteurs favorise l'auto-renouvellement et la pluripotence des ESCs. L'interprétation de ces résultats est déjà très contestée dans la littérature en raison des conditions expérimentales utilisées, très éloignées des conditions physiologiques (voir commentaire de Martinez-Arias 2014).

2.2 Les cellules souches adultes

Le rôle de YAP a été étudié dans différentes populations de cellules souches adultes mais les chercheurs se sont particulièrement focalisés sur les modèles de cellules souches intestinales, épidermiques, mésenchymateuses (Zhao, Tumaneng, et al., 2011)(Hiemer & Varelas, 2013)(Tremblay & Camargo, 2012)(Mo et al., 2014)(Huan Liu et al., 2012).

Les cellules souches intestinales

De nombreuses études ont utilisé le modèle de l'intestin de mammifère dans le but d'étudier les cellules souches somatiques adultes et plusieurs études ont décrit un rôle essentiel de la voie de signalisation Hippo dans ce modèle. Pour commencer, YAP est fortement exprimé dans les cryptes intestinales où se situent les cellules souches nécessaires à l'auto-renouvellement continu du tissu (Camargo et al., 2007). Des études génétiques chez la souris montre également que la régulation de YAP est importante dans le contrôle des propriétés des cellules souches intestinales (Camargo et al., 2007). En effet, la surexpression de la forme nucléaire de YAP dans l'intestin entraîne une augmentation de la prolifération aboutissant à une forte expansion de la population de cellules souches intestinales. Cette régulation implique bien la voie de signalisation Hippo canonique puisqu'une délétion des kinases MST1/2 ou de la protéine SAV1 induit également un phénotype d'hyperplasie provoqué par une augmentation du nombre de progéniteurs indifférenciés au sein des cryptes intestinales (Camargo et al., 2007)(Cai et al. 2010)(Zhou et al. 2011). De façon étonnante, l'inhibition de *Yap* et *Taz* ne semble pas induire de phénotype notable dans le tissu intestinal (Azzolin et al., 2014).

Les cellules souches épidermiques

L'épiderme est aussi un excellent modèle possédant des capacités de renouvellement importantes même à l'âge adulte et dans lequel, la balance prolifération/différenciation des cellules souches est essentielle. Des études chez la souris ont montré que YAP pouvaient influencer la destinée des cellules souches épidermiques. Ce dernier est majoritairement exprimé dans le noyau des cellules souches épithéliales en prolifération puis cytoplasmique lorsque ces cellules commencent leur différenciation (Schlegelmilch et al., 2011). L'inhibition de YAP dans des cultures de kératinocytes primaires supprime la prolifération et stimule les propriétés associées à la différenciation cellulaire. La perte de fonction de *Yap in vivo* induit également une diminution du nombre de progéniteurs épithéliaux et diminue l'épaisseur de la peau des souris (Schlegelmilch et al., 2011). Au contraire, la surexpression de *Yap* augmente fortement le nombre de progéniteurs en prolifération au détriment des cellules différenciées ayant pour conséquence une augmentation de l'épaisseur de la peau et le développement de tumeurs. Ces effets de YAP sur les cellules souches et les progéniteurs épidermiques sont principalement médiés par le facteur de transcription TEAD puisque l'inhibition de l'interaction YAP/TEAD empêche l'augmentation de la prolifération dans l'épiderme (Schlegelmilch et al., 2011). Le même mécanisme semble être conservé dans les kératinocytes primaires humains

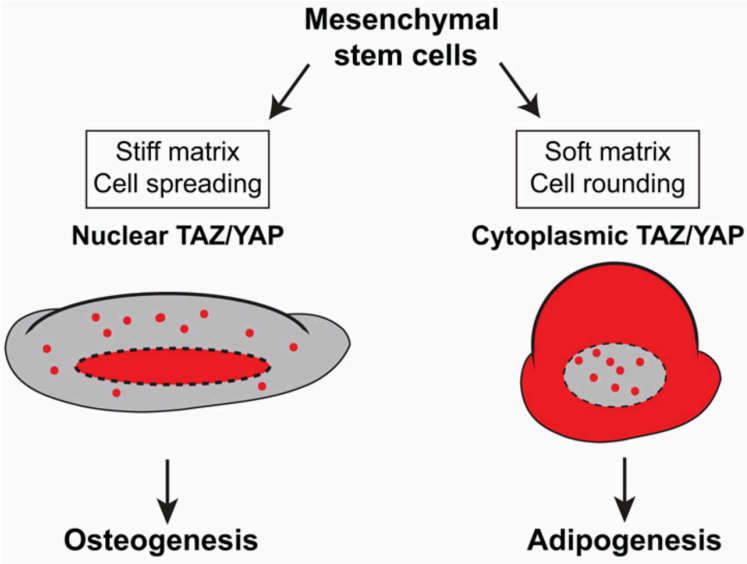


Figure 52: Rôle de YAP dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. Les forces mécaniques régulent la localisation cellulaire de YAP/TAZ qui modifie la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes ou en adipocytes. D'après (Varelas, 2014).

(D'Addario et al., 2010). Contrairement à l'implication de la voie canonique Hippo dans l'intestin, la délétion des kinases MST1/2 dans la peau ne donne pas les phénotypes obtenus après une surexpression de YAP/TAZ (Schlegelmilch et al., 2011). Cette implication variable des kinases de la voie Hippo selon les tissus montre bien que malgré la forte conservation de cette voie de signalisation, son rôle et sa régulation reste spécifique d'un tissu donné.

Les cellules souches mésenchymateuses

Enfin, des études récentes ont également impliqué la voie de signalisation Hippo dans la destinée cellulaire des cellules souches mésenchymateuses. Comme toutes les cellules souches adultes, ces cellules sont multipotentes, capables de produire plusieurs types cellulaires appartenant au tissu squelettique, tels que les cellules cartilagineuses (chondrocytes), les cellules osseuses (ostéoblastes) et en cellules graisseuses (adipocytes). Les cellules souches mésenchymateuses ont été à l'origine identifiées dans la moelle osseuse, mais on sait aujourd'hui qu'on en trouve également dans une grande variété de tissus comme le sang de cordon ombilical, le tissu adipeux ou encore les muscles. Le premier résultat impliquant YAP/TAZ dans la régulation des cellules souches mésenchymateuses est l'identification de la protéine RUNX2 comme un partenaire de YAP et TAZ (Cui et al., 2003b)(Hong et al., 2005b)(Yagi et al., 1999). RUNX2 est un facteur de transcription essentiel dans l'activation de l'ostéogenèse. Ainsi, la surexpression de *Taz* active la transcription des gènes cibles de *Runx2* et donc stimule la production d'ostéoblastes. Au contraire, la perte de fonction de *Taz* dans les cellules souches mésenchymateuses mises en culture, dans des conditions favorisant l'ostéogenèse, provoque une absence de dépôt calcique, signe d'une différentiation défectueuse (Hong et al., 2005b). De façon opposée, TAZ semble être un régulateur négatif de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes. TAZ semble donc impliqué dans le contrôle de la détermination de ces cellules souches. Le rôle de YAP dans ces cellules est beaucoup moins clair. Certains travaux montrent que YAP agit également comme un co-activateur de RUNX2 (Yagi et al., 1999). En effet, la surexpression d'une forme nucléaire de YAP semble pouvoir stimuler l'ostéogenèse (Dupont et al., 2011)(Figure 52). Alors qu'au contraire, d'autres études décrivent YAP comme un co-répresseur de RUNX2 au niveau de la région promotrice de l'*ostéocalcine* (Zaidi et al., 2004). Cette régulation semble faire intervenir une phosphorylation particulière de YAP sur son domaine SH3 par la kinase SRC. Etant donné que TAZ ne possède pas ce domaine de phosphorylation, cela pourrait donc expliquer la différence de fonctions de YAP et TAZ dans la détermination des cellules souches mésenchymateuses.

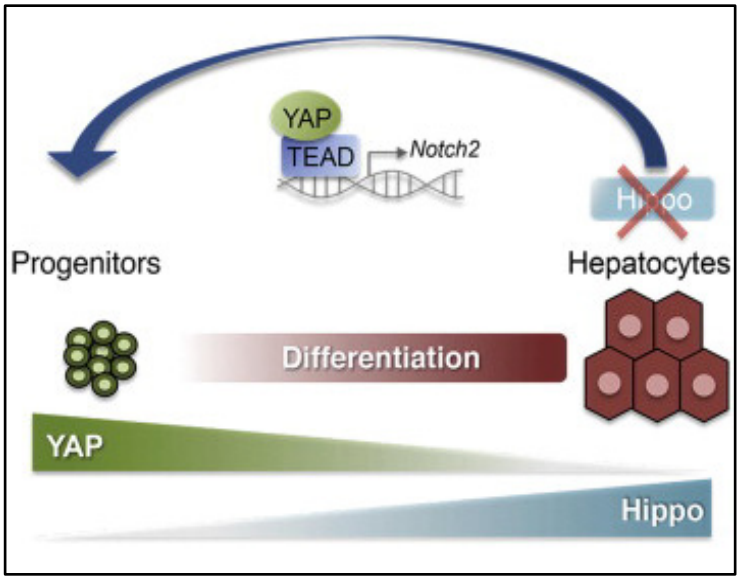


Figure 53: Rôle de YAP dans les progéniteurs hépatiques. L'expression de YAP est nécessaire au maintien de la population de progéniteurs dans le foie et sa surexpression dans des hépatocytes mâtures provoque la dédifférenciation de ces cellules. Dans ce contexte, la voie Notch semble être une cible importante de YAP dans les hépatocytes. D'après (Yimlamai et al., 2014).

Les cellules souches du foie

En raison de ces capacités de régénération et de sa plasticité importante, le modèle du foie a également été très étudié afin de comprendre le rôle de la voie de signalisation Hippo dans les cellules souches adultes *in vivo*. La perturbation de cette voie induit d'importants changements dans la prolifération des cellules hépatiques. La surexpression conditionnelle et spécifique de *Yap* dans le foie provoque une augmentation importante de la taille de cet organe en seulement quelques jours (Camargo et al., 2007)(Dong et al., 2007). Une accumulation importante de cellules ovales, considérées comme étant les cellules souches résidentes du foie, a été observée après une délétion des kinases MST1/2, de la protéine SAV ou encore de MER (Song et al., 2010)(Lu et al., 2010)(Lee et al., 2010)(Benhamouche et al., 2010). Ces données suggèrent donc que la voie Hippo est essentielle à la restriction de la prolifération des cellules ovales dans le foie. Enfin, très récemment, une équipe a observé qu'une forte expression de *Yap* était nécessaire au maintien des progéniteurs hépatiques et que son activation ectopique au sein des hépatocytes différenciés était capable de provoquer la dédifférenciation de ces cellules (Figure 53)(Yimlamai et al., 2014).

Les cellules souches hématopoïétiques

De façon très étonnante, malgré le peu de données publiées sur le rôle de YAP/TAZ dans les cellules souches hématopoïétiques, il semble que les deux effecteurs de la voie de Hippo ne possèdent pas de fonctions essentielles dans cette population de cellules souches adultes (Jansson & Larsson, 2012). Dans cette étude, les auteurs montrent pourtant que les kinases de la voie *Lats1/2, Mst1/2* sont exprimées au sein de l'ensemble des cellules hématopoïétiques et que *Yap* possède une expression beaucoup plus restreinte à une sous-population de cellules souches hématopoïétiques. Malgré cette expression, la surexpression de la forme sauvage ou constitutivement active de *Yap* n'altère ni l'hématopoïèse ni les fonctions des cellules souches hématopoïétiques *in vivo*. Etant donné l'importance des contacts cellulaires et des forces mécaniques dans la régulation de la voie Hippo, il est possible que l'influence de ces régulations soient beaucoup moins importantes dans un environnement liquide comme celui des cellules souches hématopoïétiques. Ce résultat montre donc que malgré l'importance de YAP/TAZ dans le maintien et la prolifération d'une grande variété de types de cellules souches adultes, le rôle de ces facteurs reste tissu-dépendant.

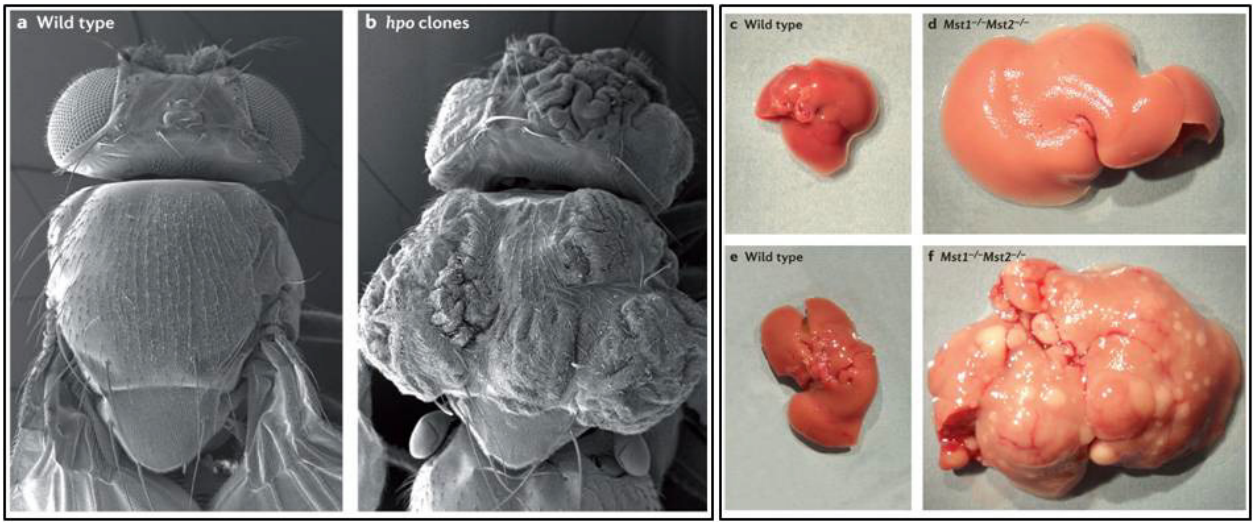


Figure 54: Phénotype obtenus par l'inactivation de la cascade de kinases Hippo chez la drosophile et la souris. Comparaison d'une mouche sauvage observée en microscopie électronique (**a**) par rapport à une mouche possédant plusieurs clones cellulaires homozygotes pour la kinase Hpo (**b**). L'inactivation de cette kinase entraîne la formation d'excroissance au niveau de la cuticule chez la mouche adulte. L'image (**c**) représente un foie de souris sauvage à deux mois en comparaison avec un foie d'une souris du même âge chez laquelle les deux kinases homologues d'Hpo, Mst1/2 ont été inactivées de façon conditionnelle durant le développement hépatique (**d**). L'image (**e**) représente un foie de souris sauvage à six mois en comparaison avec un foie de souris du même âge chez laquelle *Mst1/2* ont été inactivées de la même façon que précédemment (**f**). A ce stade, le foie ne présente pas seulement une taille plus importante mais développe également des carcinomes hépatocellulaires. D'après (Johnson & Halder, 2014).

Le rôle de YAP et TAZ n'est donc pas clairement défini dans toutes les populations de cellules souches adultes et il est important de noter que les données de la littérature dans certains systèmes sont essentiellement basées sur des expériences de surexpression du gène *Yap* (Piccolo et al. 2014). L'inactivation de ce dernier dans certains tissus comme la glande mammaire, le pancreas ou encore l'instestin ne semble pas avoir d'effets phénotypiques notables (Zhang et al., 2014)(Chen et al., 2014)(Azzolin et al., 2014). Cependant, *Yap* et *Taz* dans ces modèles semblent par contre nécessaire à la prolifération de ces cellules dans des contextes particuliers de régénération ou dans le cas de processus de transformation.

3) Cancer et voie de signalisation Hippo

L'intérêt que porte la recherche aujourd'hui pour la voie de signalisation Hippo est due en partie à l'implication de cette voie dans le développement des cancers et des tumeurs chez l'homme. La croissance tissulaire incontrôlée due à l'inactivation de la voie Hippo a d'abord été très étudié chez la drosophile mais a récemment été confirmée chez les mammifères (Figure 54) (Harvey & Tapon, 2007)(Harvey et al., 2013). En effet, la surexpression de YAP/TAZ ou l'inactivation des kinases de la voie est capable de transformer des cellules de mammifères (Zhao et al., 2012)(Lei et al., 2008)(Overholtzer et al., 2006) et d'induire des tumeurs chez les souris transgéniques (Zhang et al., 2010)(Benhamouche et al., 2010)(Lu et al., 2010)(Lee et al., 2010). Chez l'humain, des mutations du gène *Merlin* est responsable d'une maladie génétique caractérisée par le développement de tumeurs du système nerveux central appelée le syndrome de la Neurofribromatose de type II (Gutmann, Hirbe, & Haipek, 2001)(McClatchey & Giovannini, 2005). Chez la souris, l'inactivation de *Merlin* dans le foie est également à l'origine de carcinomes hépatocellulaires (Zhang et al., 2010). On retrouve un phénotype similaire lors de l'inactivation des kinases MST1/2 ou de la protéine adaptatrice SAV1 dans le foie (Figure 54)(Lu et al., 2010)(Lee et al., 2010). Dans ce modèle, la délétion hétérozygote de *Yap* est capable d'empêcher le développement de ces cancers montrant que les effets de Merlin, Mst1/2 et Sav passent bien par la voie de signalisation Hippo (Zhang et al., 2010). Les cancers du foie ne sont pas les seuls cancers répertoriés impliquant la voie Hippo. Plusieurs acteurs de la cascade Hippo ont en effet été impliqués dans le développement d'un très grand nombres de cancers. La délétion du gène *Sav1* par exemple a été retrouvée dans deux lignées cancéreuses du rein et la délétion de *Mats* a été identifiée dans des lignées cellulaires provenant d'échantillons de mélanomes humains ou de carcinomes mammaires murins (Tapon et al., 2002)(Lai et al., 2005). Un niveau élevé ainsi qu'une localisation nucléaire anormale de YAP ou de TAZ ont été observés dans un grand

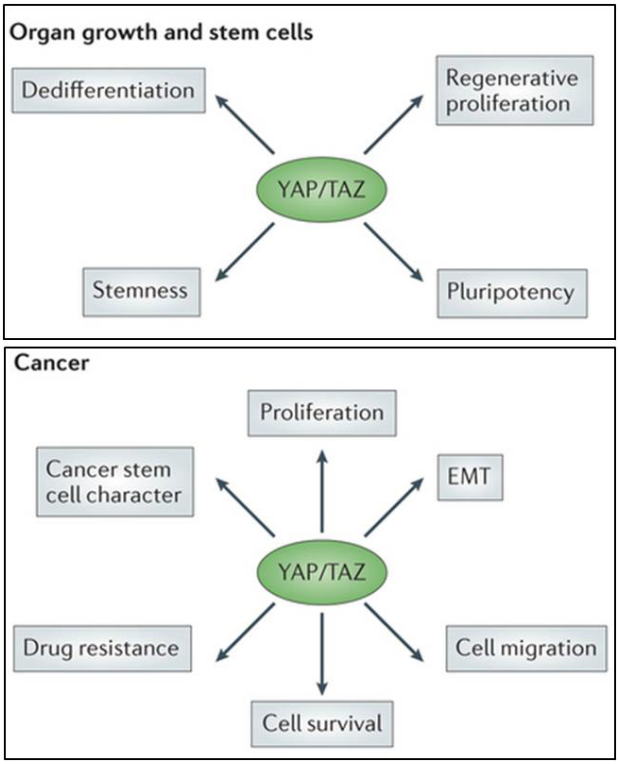


Figure 55: YAP/TAZ contrôlent plusieurs propriétés cellulaires responsable du développement de cancers mais aussi nécessaire à l'activité des cellules souches. Certaines de ces propriétés comme l'activation de la prolifération et le maintien des cellules souches sont à la fois importante pour les processus de régénération et le développement de cancers. Au contraire, d'autres propriétés semblent uniquement impliquées dans les processus de tumorigenèse. D'après (Johnson & Halder, 2014).

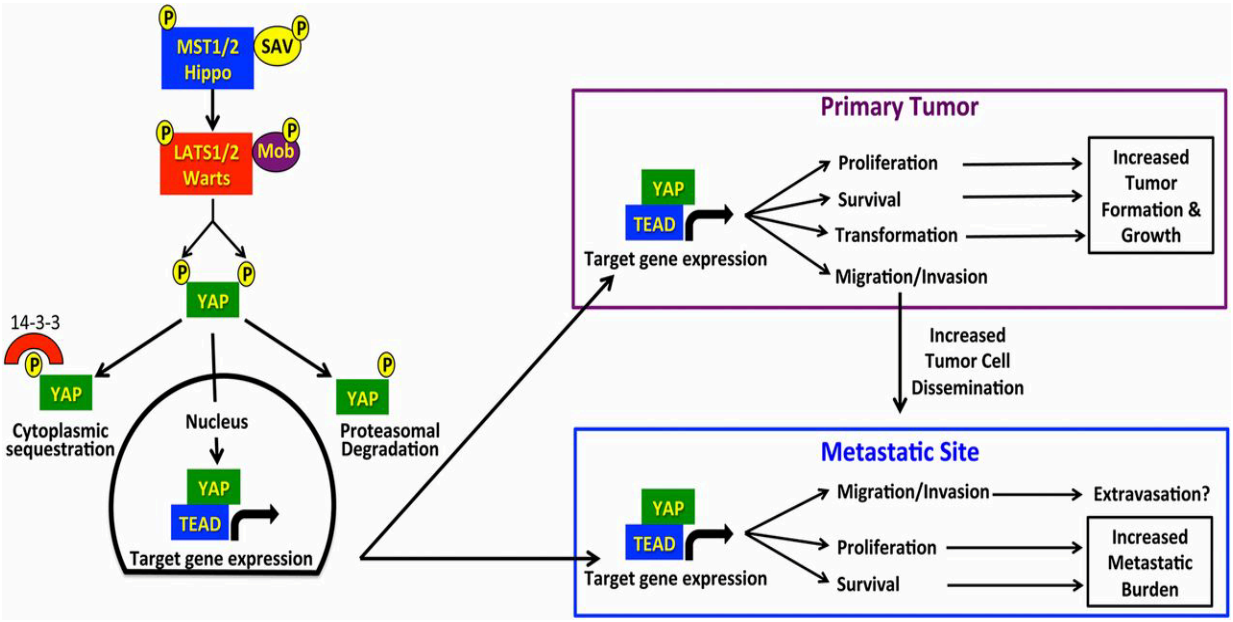


Figure 56: Rôles de YAP au cours de la progression tumorale et de la formation des métastases. L'inhibition de la voie Hippo entraîne une augmentation de l'expression des gènes cibles du complexe YAP/TEAD qui influence à la fois la croissance tumorale et la formation de métastase. D'après (Lamar et al., 2012).

nombre de tumeurs solides, représentant la majorité des cancers humains (Steinhardt et al., 2008). Les mécanismes exactes impliqués dans la transformation des cellules par YAP/TAZ ne sont pas encore connus mais provoquent une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire associés à une forte acquisition des propriétés des cellules tumorales comme la résistance aux drogues, la transition épithélio-mésenchymateuse l'inhibition de la sénescence ou encore l'acquisition des caractéristiques des cellules souches cancéreuses (Johnson & Halder, 2014)(Figure 55 et 56). Comme décrit précédemment, la voie de signalisation Hippo est étroitement liée à la régulation des propriétés des cellules souches et cette régulation s'étend aussi aux cellules souches cancéreuses. Dans le cancer du sein par exemple, TAZ a été décrit comme étant un puissant stimulateur de la formation de cellules souches cancéreuses *in vitro* (Cordenonsi et al., 2011). Les auteurs de cette étude ont en effet montré que la surexpression de *Taz* dans des cellules MFC10A augmentait la capacité de ces cellules à former des "mammosphères" et donc augmentait la proportion de cellules souches cancéreuses capable d'auto-renouvellement. Ainsi, l'activation de *Taz* est donc un événement majeur de l'apparition ou de la progression des cancers du sein. YAP n'a pas encore été décrit comme inducteur des cellules souches cancéreuses mais plusieurs études ont démontré la capacité de YAP à pouvoir induire des caractéristiques identiques à celles des cellules cancéreuses des cellules épithéliales de la glande mammaire non transformées (Overholtzer et al., 2006). Parmi ces caractéristiques, la surexpression de YAP et TAZ est par exemple responsable de la transition epithélio-mésenchymateuse (Overholtzer et al., 2006)(Lei et al., 2008)(Cordenonsi et al., 2011). Récemment, une équipe a d'ailleurs mis en évidence que les effecteurs de la voie Hippo, YAP et TAZ participent au comportement métastatique des cellules du mélanome bien connu pour ses propriétés invasives (Nallet-Staub et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'inhibition de *Yap* ou de *Taz* réduit considérablement *in vitro* leurs propriétés tumorales et invasives ainsi que leur capacité à coloniser les poumons *in vivo*. Aujourd'hui, les mécanismes à l'origine d'une dérégulation de YAP et TAZ dans les cancers humains ne sont pas encore élucidés mais semblent faire intervenir des événements épigénétiques. Ces mécanismes incluent par exemple une hyperméthylation des régions promotrices des suppresseurs de tumeurs *Mst1/2* (Seidel et al. 2007) et *Lats1/2* (Jiang et al., 2006). Les mi-RNA ont également été impliqués dans l'inhibition de l'expression des kinases de la voie Hippo comme *Lats2* par les mi-R372 et R373 dans certains cancers (Voorhoeve et al., 2006).

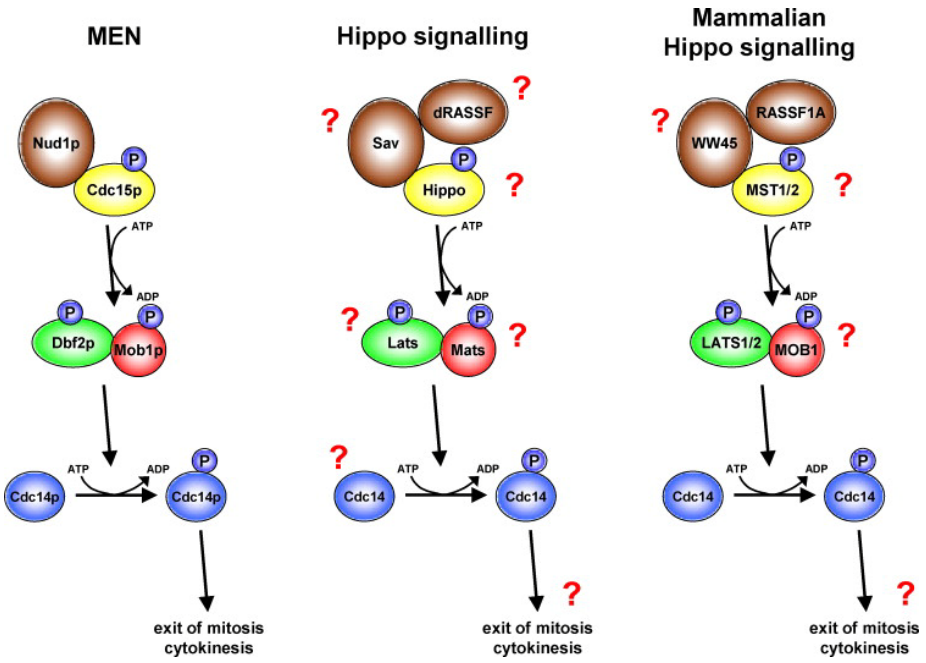


Figure 57: Comparaison de la voie MEN/SIN et de la voie Hippo dans la régulation de la mitose. Les trois voies de signalisation présentent de nombreuses similarités structurales. Les protéines représentées en vert sont des protéines de la famille des LATS/NDR kinases, en jaune, des protéines de la famille des Ste-20 like kinases, en rouge et en marron, des protéines adaptatrices MOB et SAV respectivement. D'après (Hergovich & Hemmings, 2012).

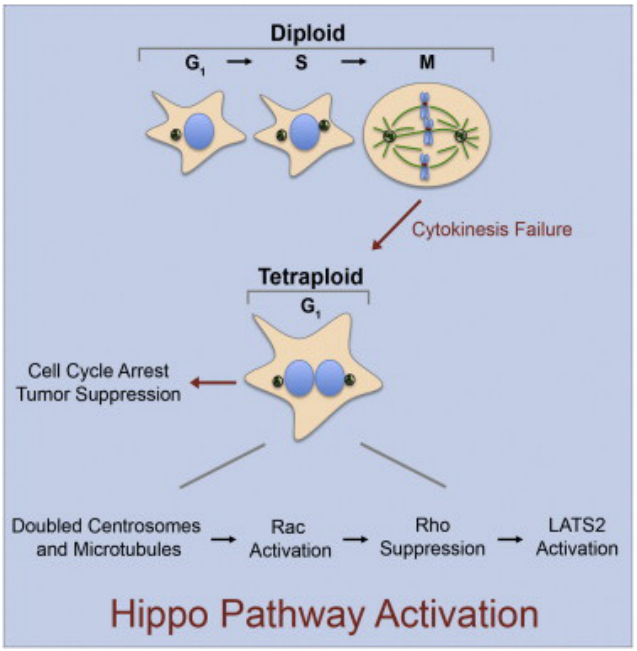


Figure 58: Rôle de la voie de signalisation Hippo dans les cellules tétraploïdes. La formation de cellules tétraploïdes active la cascade de kinases Hippo. La formation de centrosomes surnuméraires dans une cellule réduit l'activité de la protéine RhoA aboutissant à l'activation de la kinase LATS2. L'activation de cette dernière active et stabilise p53 et inactive YAP/TAZ dans ces cellules. D'après (Ganem et al., 2014).

4) Rôle de la voie de signalisation Hippo dans le contrôle du cycle cellulaire

Les anomalies chromosomiques sont fréquentes dans les cellules tumorales et la présence d'un nombre anormal, en général excessif, de chromosomes est retrouvée dans un grand nombre de ces cellules. Ces caractéristiques peuvent être dues à des erreurs commises à certains points de contrôle du cycle cellulaire, en particulier lors de l'étape de mitose. Chez la levure où ces mécanismes de contrôle ont été intensivement étudiés, la voie MEN/SIN (Mitotic Exit Network (dans la levure bourgeonnante)/Septation Initiation Network (dans la levure fissile)) permet de contrôler l'orientation du fuseau mitotique permettant ainsi une bonne distribution du matériel génétique entre les deux cellules filles et provoque également la transition M/G1 en inactivant la CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1). De façon étonnante, le cœur de cette voie est composé de plusieurs membres de la famille des Ste20-like kinase, des protéines adaptatrices MOB, des kinases LATS/NDR ainsi que de la phosphatase Cdc14 (Figure 57)(Hergovich & Hemmings, 2012). La voie MEN/SIN et la voie Hippo possèdent donc de nombreuses similarités. Toutes ces ressemblances ont ainsi suscité l'intérêt de plusieurs équipes à s'intéresser au rôle de la voie Hippo dans le contrôle de la division cellulaire. Dès 2004, une équipe avait déjà identifié les kinases HPO et LATS comme des facteurs essentiels à la progression du cycle cellulaire chez la drosophile (Bettencourt-Dias et al., 2004). La perte de fonction de *Hpo* provoque des défauts d'organisation du fuseau mitotique suggérant un rôle de ce facteur dans la progression de la mitose alors que celle de *Lats* aboutît à une augmentation de la proportion de cellules en G1. Etant donné que *Lats* est également capable d'inhiber la CDK1 (Tao et al., 1999), cette kinase pourrait donc permettre le passage de la transition G2/M. Cependant, les cellules *Hpo*$^{-/-}$ provenant d'ailes ou d'œil chez la drosophile ne montrent pas de défauts de progression du cycle cellulaire montrant que son rôle dans le contrôle de la mitose pourrait être tissu spécifique (Wu et al., 2003)(Harvey et al., 2003). L'autre composant de la voie Hippo faisant également partie de la voie MEN/SIN est la protéine adaptatrice MATS (Figure 57). Un article a en effet mis en évidence le rôle de MATS dans la ségrégation des chromosomes chez la drosophile (Shimizu, Ho, & Lai, 2008). Cette étude suggère donc un rôle essentiel de MATS au cours de la division cellulaire bien que son mécanisme d'action ne soit pas encore connu. Chez les mammifères, deux équipes ont décrits un rôle des kinases MST1/2 au cours de la mitose. Alors que MST1 active la kinase Aurora B responsable de l'attachement des chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique (Oh et al., 2010), MST2 semble jouer un rôle essentiel dans l'alignement des chromosomes durant la métaphase dans des cellules en culture (Chiba et al., 2009). La kinase LATS1 semble aussi avoir un rôle dans la régulation de la mitose chez les mammifères puisque

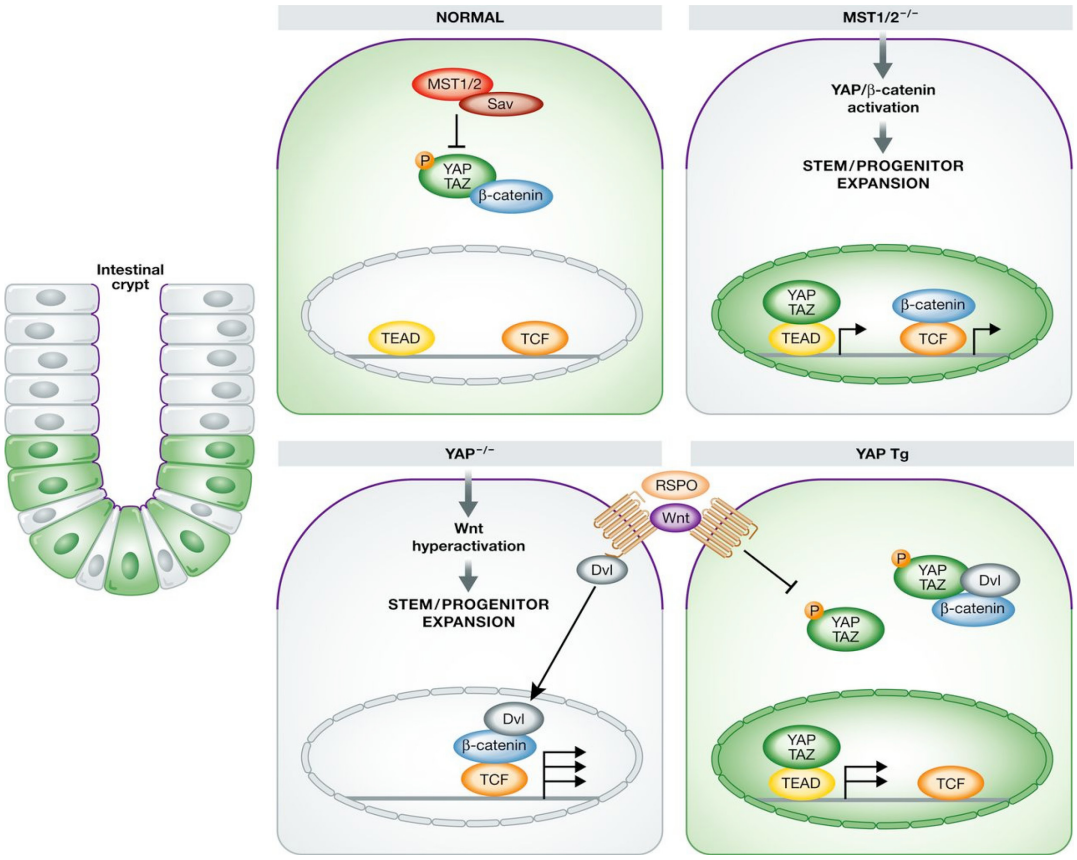


Figure 59: Rôle de YAP dans la régénération de l'intestin chez les mammifères. Dans les cellules souches intestinales, la voie Hippo phosphoryle YAP et inhibe son activité nucléaire. Le YAP cytoplasmique fixe alors directement la β-caténine et inhibe la voie Wnt. Dans un épithélium intestinal mutant Mst1/2 $^{-/-}$, YAP n'est plus phosphorylé et peut transloquer dans le noyau où, de la même façon que la β-caténine, activer la transcription de ses cibles. Cette activation provoque ainsi l'expansion des cellules souches intestinales. Un second modèle décrivant le rôle de YAP dans la régénération de l'intestin a été proposé. La délétion de YAP dans l'épithélium intestinal, l'hyperactivation de la voie Wnt/β-caténine est à l'origine de l'expansion de la population de cellules souches. Au contraire, la surexpression de YAP inhibe l'activité Wnt en empêchant la translocation nucléaire de DVL. D'après (Mo et al., 2014).

elle a été décrite comme un inhibiteur de la CDK1 et que sa surexpression entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G2/M (Tao et al., 1999)(Xia et al., 2002). De façon intéressante, LATS1 semble également nécessaire au point de contrôle au sein de la phase S du cycle cellulaire après la détection d'un dommage de l'ADN (Matsuoka et al., 2007). LATS2 semble agir au sein du cycle cellulaire en régulant négativement à la fois la transition G1/S et G2/M (Li et al., 2003)(Kamikubo et al., 2003). De plus, les cellules déficientes pour le gène *Lats2* présentent des défauts lors de la phase de mitose ainsi que des problèmes lors de l'étape de cytodiérèse (McPherson et al., 2004)(Yabuta et al., 2007). Enfin, un article publié cette année montre une activation de *Lats2* dans les cellules tétraploïdes alors que son inhibition provoque la formation de cellules en mitose binuclée (Figure 58)(Ganem et al., 2014)(Zhao & Guan, 2014). L'ensemble de ces résultats montre un rôle essentiel de certains composants de la cascade de kinases Hippo indépendamment dans les différentes phases du cycle cellulaire. Le peu de travaux sur le sujet ne permet pas aujourd'hui de décrire les mécanismes responsables de cette régulation mais l'inhibition de la voie semble responsable du développement d'une instabilité génomique.

5) La voie de signalisation Hippo dans les processus de régénération

Les processus de régénération et de réparation tissulaire implique la plupart du temps l'activation de la prolifération des populations de cellules souches et de progéniteurs. Etant donné le rôle de YAP/TAZ dans le contrôle de la balance prolifération /différenciation de ces cellules dans plusieurs tissus, de nombreuses études commencent à mettre en lumière les fonctions essentielles de la voie de signalisation Hippo dans les mécanismes de régénération.

Régénération de l'intestin

Dans un premier temps, c'est dans l'épithélium intestinal que la fonction de YAP dans une réponse régénérative a été testée. Plusieurs études ont montré le rôle essentiel de YAP/Yki dans la réparation tissulaire de l'intestin aussi bien chez la drosophile que chez les mammifères. Dans les deux modèles, les auteurs observent une expression restreinte de YAP/Yki dans les cryptes intestinales et montrent qu'une inhibition de la voie Hippo induit une hyperplasie de l'épithélium du tube digestif (Karpowicz, Perez, & Perrimon, 2010)(Cai et al., 2010)(Zhou et al., 2011). Afin d'étudier le rôle de YAP dans les procesus de régénération, une première étude utilisant des souris traitées au dextran sulphate de sodium a été publiée (Cai et al., 2010). Cette solution provoque des lésions intestinales et est donc couramment utilisée comme modèle des

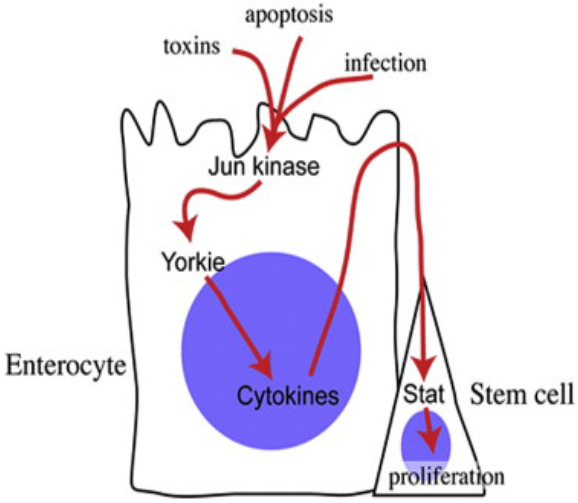


Figure 60: YKI dans la régénération intestinale chez la drosophile. YKI est activé dans les entérocytes en réponse à une lésion intestinale par l'intermédiaire de l'activation de la voie Jnk. Cette activation permet d'activer l'expression de cytokines, molécules sécrétées responsable de la prolifération des cellules souches intestinales D'après (Staley & Irvine, 2010).

inflammations du tube digestif. Dans ce modèle, les auteurs observent bien une augmentation de l'expression de YAP dans les cryptes intestinales deux jours après avoir administré le traitement. L'inactivation de YAP ne semble pas modifier l'homéostasie du tissu intestinal mais réduit fortement la réponse régénérative en cas de lésions (Cai et al., 2010).De façon similaire, l'inhibition de la voie Hippo dans des cryptes intestinales déficientes pour le gène *Sav* ou pour les gènes *Mst1/2* montre une accélération du processus de régénération due à une augmentation de l'activité nucléaire de YAP (Cai et al., 2010)(Zhou et al., 2011). En parallèle de ces travaux, une autre équipe a montré des résultats contradictoires sur le rôle de YAP dans les processus de régénération dans l'intestin chez la souris. Cette fois, les auteurs montrent que l'inactivation de YAP dans l'intestin entraîne une activation de la voie de signalisation Wnt et active les processus de réparation tissulaire après irradiation des animaux (Barry et al., 2013)(Figure 59). Au contraire, la surexpression spécifique de YAP dans l'épithélium intestinal supprime le renouvellement du tissu et réduit la population de cellules souches intestinales en inhibant la voie de signalisation Wnt. Les résultats contradictoires de ces deux études ne sont pas encore compris mais peuvent peut être s'expliquer par les différents modèles de régénération ou les protocoles utilisés. Chez la drosophile, Yki est aussi requis pour activer la prolifération des cellules souches intestinales après une lésion (Staley & Irvine, 2010)(Shaw et al., 2010)(Karpowicz et al., 2010)(Ren, Wang, et al., 2010). Cependant, Yki utilisent des mécanismes différents de ceux retrouvés chez les mammifères. Il est activé dans des cellules différenciées de l'intestin, les entérocytes et active l'expression de cytokines responsable de l'activation des cellules souches intestinales (Staley & Irvine, 2010)(Figure 60). Cette activation de Yki dans les enterocytes montre ainsi un mécanisme non autonome cellulaire qui semble impliquer la voie de signalisation JNK (c-Jun N-terminal Kinase). Bien que les mécanismes soient encore mal compris, l'ensemble de ces données montre l'implication de YAP/Yki dans les processus de régénération de l'intestin. D'autres études récentes suggèrent également que YAP pourrait jouer un rôle dans la régénération d'autres organes comme le foie ou le cœur chez les mammifères.

Régénération du foie

Le foie possède une capacité de régénération importante principalement due à l'activité proliférative des hépatocytes et dans certains cas, des cellules progénitrices appelées cellules ovales . Malgré les nombreuses études démontrant le rôle de la voie Hippo dans le contrôle de la prolifération des hépatocytes et dans le développement de cancers du foie, peu de données ont encore été publiées sur le rôle physiologique de la voie Hippo dans les processus de régénération hépatique. Une équipe a montré que l'ablation d'une partie du foie provoque une augmentation de la localisation nucléaire de YAP, de l'expression de ses gènes cibles et une

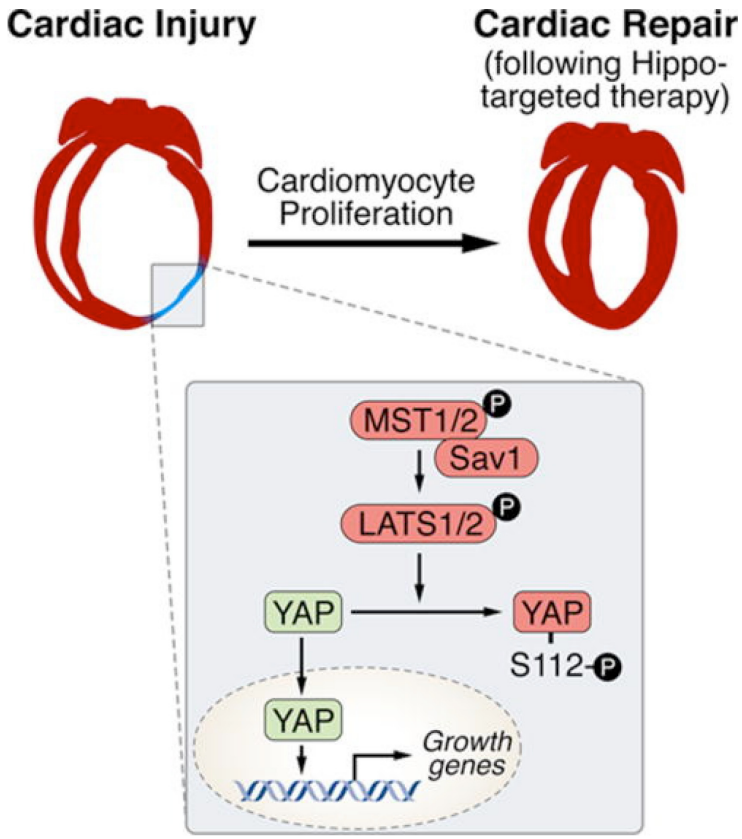


Figure 61: Rôle de la voie de signalisation Hippo dans les processus de régénération du tissu cardiaque. L'inhibition des composants de la cascade de kinase Hippo ou la surexpression de *Yap* permet de stimuler la prolifération des cardiomyocytes et d'augmenter la régénération cardiaque. D'après (Papizan & Olson, 2014).

diminution de l'expression des différentes kinases de la voie Hippo (Grijalva et al., 2014). Une semaine après l'ablation, le foie retrouve son poids normal et cette étape est coordonnée avec une diminution de l'expression nucléaire de YAP à un niveau basal et une activation de la voie Hippo (Grijalva et al., 2014). De la même façon, chez l'homme, des patients atteints d'une cholestase hépatique avancée caractérisée par des lésions dues à l'acidité de la bile, montrent une très forte expression nucléaire de YAP (Bai et al., 2012). Bien que la modification de l'expression nucléaire de YAP semble parfaitement corréler avec une régénération hépatique, des études supplémentaires sont nécessaires pour véritablement démontrer son rôle dans la régénération de cet organe.

Régénération du tissu cardiaque

Contrairement au foie, le cœur possède des propriétés de régénération beaucoup plus restreintes. Durant le développement embryonnaire, le cœur possède la capacité de régénérer après une lésion du myocarde mais cette capacité persiste seulement quelques jours après la naissance (Porrello et al., 2011). Suite à une amputation de la zone apicale du cœur ou à une lésion du myocarde, cette régénération embryonnaire est principalement assurée par la prolifération des cardiomyocytes. Ces dernières années, plusieurs publications ont démontré le rôle essentiel de la voie de signalisation Hippo dans la régulation de la prolifération des cardiomyocytes, suscitant ainsi la possibilité que cette voie, et en particulier l'activité de YAP, pourrait améliorer les capacités régénératives du tissu cardiaque (Xin et al., 2012)(Heallen et al., 2011)(von Gise et al., 2012)(Papizan & Olson, 2014). Ainsi, deux équipes ont montré que la surexpression d'une forme constitutivement active de *Yap* ou l'inactivation de *Sav1* ou *Lats1/2* était capable d'étendre les capacités de régénération et de réduire temporairement les effets provoqués par une ischémie chez les nouveaux-nés (Figure 61)(Xin et al., 2013)(Heallen et al., 2013). Au contraire, la perte de fonction conditionnelle de *Yap* dans les cardiomycytes inhibe les processus de régénération (Xin et al., 2013). Cette dernière équipe a également étudié l'implication de *Yap* dans la prolifération des cardiomyocytes adultes après une lésion. Dans ce cas, les auteurs montrent que la surexpression de *Yap* à 28 jours permet une meilleure préservation des fonctions cardiaques, augmente la prolifération des cardiomyocytes et diminue la formation de tissus cicatriciels normalement observée après une lésion du myocarde. Des résultats similaires ont été obtenus après l'inactivation de *Lats1/2* ou du gène *Sav* dans les cardiomyocytes adultes avec un taux de prolifération un peu plus important qu'après la surexpression de *Yap* (Heallen et al., 2013). Ces résultats ont été récemment confirmés par l'utilisation d'autres constructions chez la souris et suggère qu'il pourrait être également à l'origine de la réponse inflammatoire importante dans le processus de régénération

(Lin et al., 2014). Malgré tout, ces résultats sont beaucoup moins importants que ceux obtenus lors de la régénération néonatale et restent insuffisant pour assurer un processus de régénération efficace (Lin & Pu, 2014).

Régénération des membres

Enfin, très récemment, une équipe a utilisé le xénope comme modèle dans le but d'étudier l'implication de YAP dans les processus de régénération. Contrairement aux mammifères, les amphibiens possèdent de grandes capacités régénératives et peuvent régénérer des structures complexes du corps avant la métamorphose. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'expression de YAP est augmenté lors du processus de régénération des membres chez le têtard (Hayashi et al., 2014). L'utilisation d'animaux transgéniques exprimant un dominant négatif de YAP réduit la prolifération et induit de l'apoptose de façon ectopique diminuant ainsi l'efficacité de régénération des membres (Hayashi et al., 2014). Pour finir, YAP a également été montré comme essentiel à la régénération des Plathelminthes (Demircan et al. 2013) et à la régénération des pattes chez le criquet (Bando et al., 2009).

Toutes ces données suggèrent que l'effecteur de la voie Hippo, YAP, joue un rôle essentiel au cours des processus de régénération bien que son activation ne soit pas toujours suffisante pour induire une réparation efficace dans tous les tissus, en particulier chez l'adulte. Un des enjeux dans ce domaine est donc de comprendre la différence de mode d'action de ce facteur au cours des processus de régénération durant le développement embryonnaire et post-embryonnaire.

6. LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO DANS LE SYSTEME NERVEUX

Peu de données sont encore disponibles concernant le rôle de la voie de signalisation Hippo dans le système nerveux et les premières études se sont focalisées sur les fonctions de cette voie dans les populations de progéniteurs neuraux au cours du développement. Ces travaux ont donc principalement été réalisés dans le tube neural en formation et la rétine embryonnaire.

1) La voie de signalisation Hippo dans le tube neural

Dans le tube neural en développement du poulet et du xénope, la surexpression de *Yap* aboutit à une augmentation importante du nombre de progéniteurs marqués par le gène *Sox2*

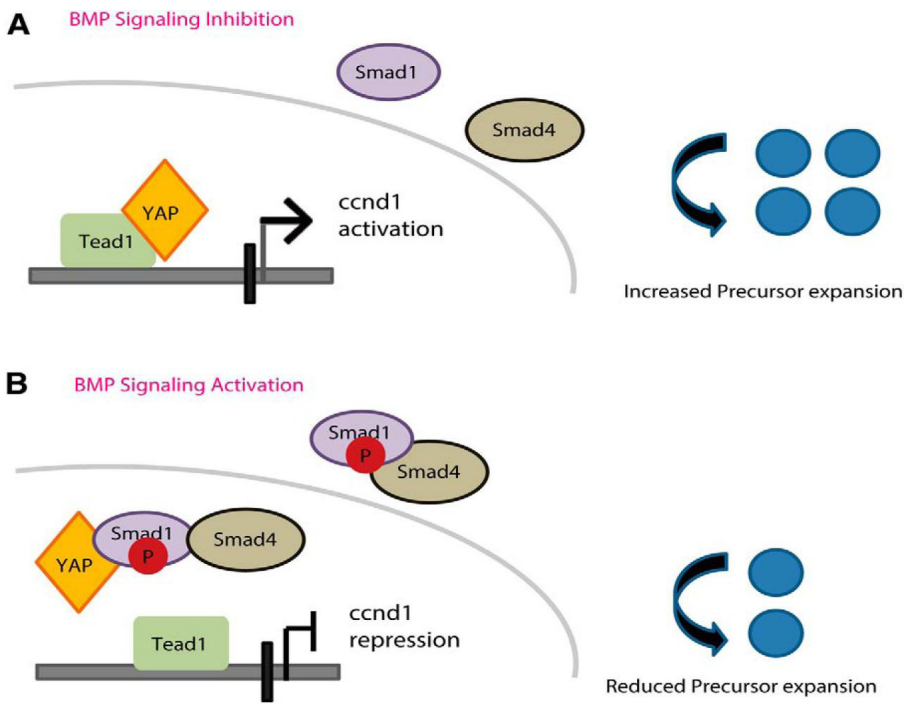


Figure 62: La voie de signalisation BMP2/SMAD inhibe la prolifération des cellules souches neurales embryonnaires en contrôlant négativement le complexe YAP/TEAD. (**A**) En absence de stimulation de la voie BMP, SMAD1 et SMAD4 restent dans le cytoplasme. La protéine YAP nucléaire se lie à TEAD et active la transcription de ses cibles comme la *cycline D1* provoquant ainsi une augmentation de la prolifération cellulaire. (**B**) Une activation de la voie BMP provoque la translocation de SMAD1 et SMAD4 qui rentrent alors en compétition avec TEAD dans la fixation de YAP. D'après (Yao et al., 2014).

(Cao et al., 2008)(Gee et al., 2011). L'expansion du territoire d'expression du gène *Sox2* est associée à une inhibition de l'expression de plusieurs marqueurs de différenciation neuronale comme *neuroD* ou *p27*^{Xic1} nécessaire à la sortie du cycle cellulaire. Dans ces deux études, le facteur de transcription TEAD joue un rôle essentiel dans le contrôle des progéniteurs neuraux. En effet, la surexpression d'une forme de YAP délétée de son domaine d'interaction avec les protéines TEADs n'augmente pas le nombre de progéniteurs suggérant que la fixation du facteur TEAD est essentiel à l'activité de YAP (Cao et al., 2008). Les auteurs montrent que ce phénotype de gain de fonction de *Yap/Tead* est dû à une accélération du cycle cellulaire associé à un retard de la sortie de cycle. Les mécanismes impliqués dans cette régulation ne sont pas encore connus mais semblent faire intervenir en partie l'activation de régulateurs du cycle cellulaire comme la *cycline D1.* De façon étonnante, l'étude de la perte de fonction de *Yap* et *Tead* montre une augmentation de la mort cellulaire par apoptose mais ne modifie pas la prolifération des progéniteurs. Malgré tout, l'inhibition de l'expression de leurs gènes cibles à l'aide des constructions *Yap*-EnR (Engrailed) et *Tead*-EnR entraîne une sortie de cycle précoce ainsi qu'une différenciation prématurée des progéniteurs neuraux (Cao et al., 2008). Dans ces modèles, les effets du complexe YAP-TEAD semblent passer par la voie canonique Hippo puisque la perte de fonction des kinases *Mst1/2* et *Lats1/2* provoque un phénotype similaire. Dans un autre contexte, une autre étude a également mis en évidence le rôle de *Yap* et de la *cycline D1.* Dans les cellules souches neurales embryonnaires, les auteurs montrent que la voie du BMP2 inhibe la prolifération cellulaire par l'intermédiaire du complexe YAP/TEAD (Yao et al., 2014). L'activation de la voie BMP favorise l'interaction entre YAP et SMAD1/4 forçant ainsi la localisation cytoplasmique de YAP aux dépens de son interaction nucléaire avec TEAD. Enfin, après avoir démontré que la *cycline D1* est une cible directe du complexe YAP/TEAD dans les cellules souches neurales embryonnaires, les auteurs proposent un modèle dans lequel le complexe YAP/TEAD pourrait être un régulateur clé de la prolifération de ces cellules en contrôlant positivement l'expression de la *cycline D1* (Figure 62). Chez le poisson, YAP semble également jouer un rôle essentiel dans la neurogenèse (Jiang et al., 2009). Les embryons injectés avec un morpholino anti-*Yap* présentent une tête de taille réduite et ce phénotype de perte de fonction est associé à une augmentation de la mort cellulaire dans le cerveau comme observé chez le poulet. Enfin, certains composants en amont du cœur de la voie Hippo ont également été impliqués dans la régulation de l'activité de YAP dans le tube neural comme la proto-cadhérine FAT4. L'inhibition de l'expression de *Fat4* augmente le nombre de progéniteurs neuraux de façon dépendante de YAP aussi bien chez le poulet que chez la souris (Cappello et al., 2013)(Van Hateren et al., 2011). Récemment, une autre étude a aussi montré que *Merlin* limite la prolifération des progéniteurs neuraux en régulant négativement l'activité de YAP et TAZ dans la

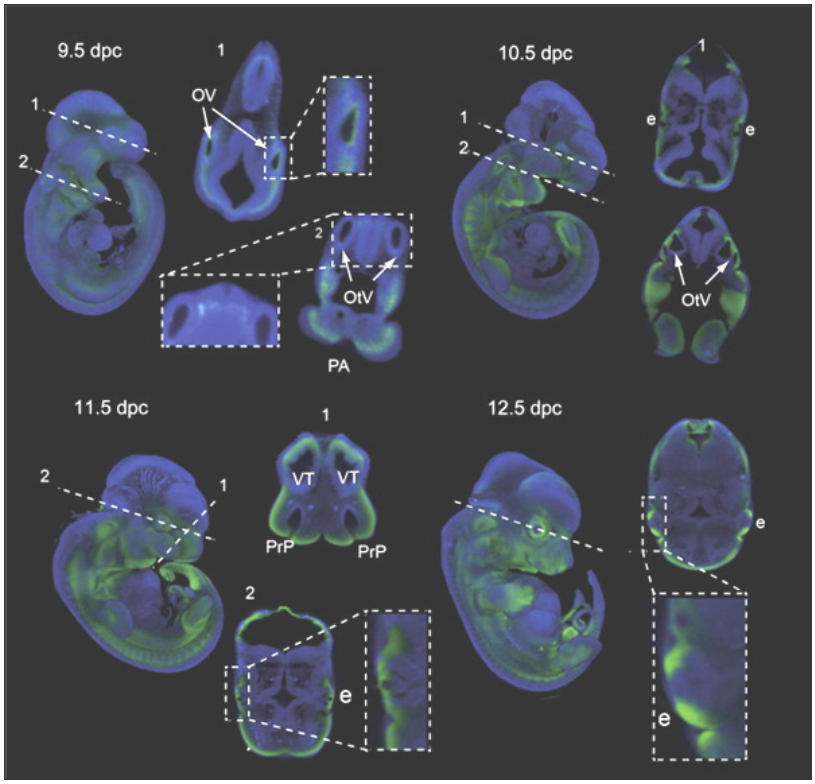


Figure 63: Expression de *Yap* au cours du développement précoce chez la souris. A chaque stade, une reconstitution 3D est présentée à gauche. Les lignes pointillées et les chiffres indiquent la position et l'angle des coupes montrées à droite. Abréviations utilisées: OV: optic vesicle; OtV: otic vesicle; PA: pharyngeal arch; e: eye; PrP: fusing primary palate: VT: ventral telencephalon. L'expression de *Yap* est montrée en vert. D'après (Williamson et al., 2014).

région dorsal du télencéphale chez la souris (Lavado et al., 2013). L'ensemble de ces données montre que YAP est suffisant pour augmenter la prolifération des progéniteurs neuraux et au contraire inhiber leur différenciation. Les expériences de perte de fonction sont par contre plus complexes à analyser et nécessitent des expériences supplémentaires pour comprendre le rôle de YAP dans la progression du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux.

2) La voie de signalisation Hippo dans la rétine

L'œil est le deuxième modèle que les chercheurs ont utilisé pour étudier le rôle de la voie de signalisation Hippo dans le système nerveux.

2.1 Expression des effecteurs de la voie Hippo dans l'œil

En 2009, une première équipe réalise l'analyse de l'expression de *Yap in toto* au cours du développement chez le poisson zèbre et montre que ce dernier est fortement exprimé dans le cerveau et les yeux chez ce modèle (Jiang et al., 2009). Une analyse identique a également été faite au cours du développement embryonnaire de la souris. Ces travaux montrent que l'expression de *Yap* dans l'œil est clairement visible dès le stade 10.5 dpc (particulièrement marquée dans l'extrémité distale des cupules optiques)(Figure 63)(Williamson et al., 2014). Les immunomarquages réalisés par cette même équipe confirme cette expression au sein de la rétine présomptive et montre également une expression au sein de la vésicule cristallinienne et du futur nerf optique. De façon plus précise, *Yap* semble exprimé dans les progéniteurs rétiniens en prolifération au cours de la première semaine du développement post-natal chez la souris (Huanqing Zhang et al., 2012). Enfin, le développement et la caractérisation de lignées transgéniques rapportrices de l'activité YAP/TAZ/TEAD basée sur le promoteur synthétique 4xGTIIC (contenant 4 sites consensus de fixation de la protéine TEAD) chez le poisson a permis de mettre en évidence une forte activité de ce complexe dans le cristallin et l'EPR (Miesfeld & Link, 2014). L'ensemble de ces données suggère que *Yap* pourrait jouer à la fois un rôle dans la rétine neurale, l'EPR et le cristallin.

2.2 Rôle des effecteurs de la voie Hippo dans la rétine

Au début de ma thèse, une étude réalisée chez le poisson zèbre suggéraient déjà que YAP pouvait avoir un rôle essentiel dans le développement des yeux. En effet, le phénotype de perte de fonction de *Yap* dans ce modèle réduit la taille des yeux des embryons injectés avec un

Morpholino, suggérant que YAP pourrait être un régulateur de la prolifération et/ou de la survie cellulaire dans cet organe (Jiang et al., 2009).

Effets sur la prolifération cellulaire

Une étude fonctionnelle de *Yap* au cours de la rétinogenèse a été réalisée chez la souris (Huanqing Zhang et al., 2012). Dans ce modèle, la surexpression de *Yap* permet de prolonger la prolifération dans la rétine post-natale alors que la perte de fonction du gène *Yap* aboutit à une diminution de l'incorporation de BrdU dans la rétine embryonnaire associée à une différenciation prématurée des progéniteurs rétiniens (Huanqing Zhang et al., 2012). La réalisation d'expériences de surexpression sur les lignées rapportrices de l'activité YAP/TAZ/TEAD décrite précédemment montre que l'injection d'ARNm *Yap* ou *Taz* provoque une expression ectopique du rapporteur dans les progéniteurs rétiniens (Miesfeld & Link, 2014). De façon similaire à la situation décrite dans le tube neural, *Yap* semble donc suffisant pour induire une prolifération ectopique dans la rétine. Dans un autre contexte, le co-activateur TAZ a été impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules de l'EPR. Les auteurs montrent que TAZ peut se lier à la région promotrice du gène *Zeb1*, surexprimé au cours de la dé-différenciation des cellules de l'EPR en culture. Cette surexpression semble être responsable de la prolifération ainsi que de l'inhibition de la différenciation de ces cellules. Dans ce contexte, la perte de fonction de *Taz* empêche ainsi les effets provoqués par la surexpression de *Zeb1* lors de la dédifférenciation des cellules de l'EPR en culture (Liu et al., 2010).

Effets sur le cycle cellulaire

Le phénotype d'hyperprolifération observé dans les expériences de gain de fonction du gène *Yap* dans la rétine est associé à un retard de la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens (Huanqing Zhang et al., 2012). Cet effet semble en partie dû à une inhibition de l'expression de *Neurog2* et *Ascl1,* deux gènes suffisants pour induire la sortie de cycle et la différenciation neuronale *in vitro*. Récemment, une équipe a observé indirectement les fonctions de YAP sur le cycle cellulaire dans la rétine. Dans cette étude, les auteurs montrent que la perturbation de la progression et de la sortie du cycle cellulaire obtenue après une perte de fonction des gènes *Crb1* et *Crb2* dans la rétine peut être en partie expliquée par une inhibition de l'expression de *Yap* ainsi que de ses gènes cibles (Pellissier et al., 2013). Cette perturbation consiste essentiellement à une modification de la répartition des cellules dans le cycle avec une diminution du nombre de progéniteurs en phase G1 et au contraire, une augmentation en phase S et G2/M. Enfin, l'inhibition de l'interaction YAP-TEAD, à l'aide d'un agent pharmacologique,

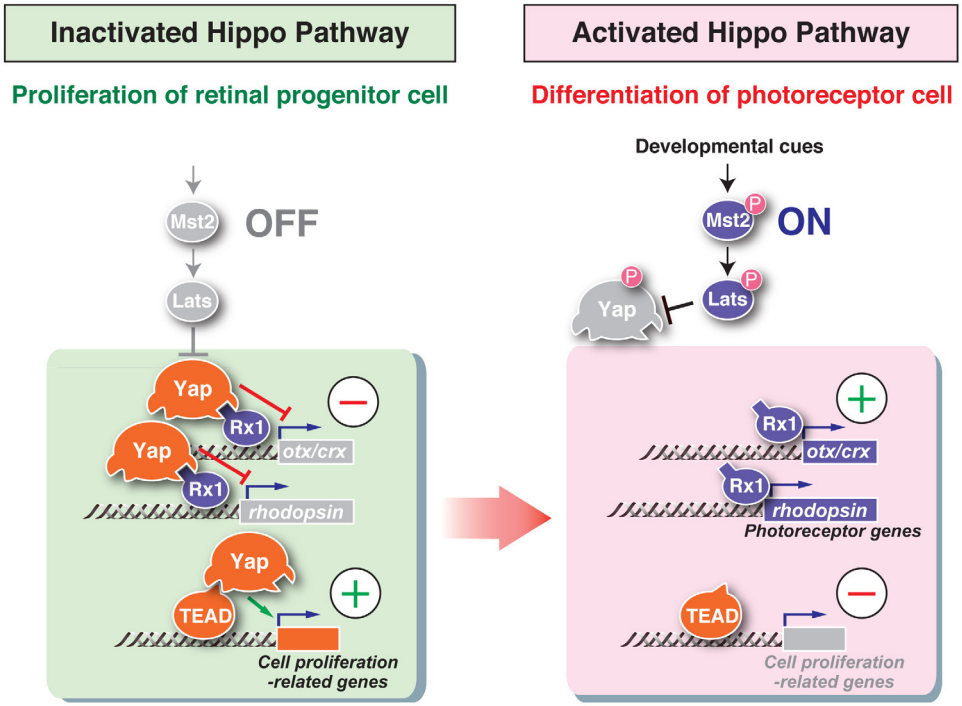


Figure 64: Rôle de la voie Hippo dans la balance prolifération/différenciation des photorécepteurs. (**A gauche**) Lorsque la voie Hippo est inactive, YAP active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire en association avec le facteur de transcription TEAD. En parallèle, YAP en association avec le facteur RX1 réprime la transcription d'autres gènes comme *Otx*, *Crx* ou indirectement la *Rhodopsine* nécessaire à la différenciation des photorécepteurs. (**A droite**) Quand la voie Hippo est active, YAP est séquestré dans le cytoplasme et TEAD seul n'est pas capable d'induire la transcritpion des gènes impliqués dans la prolifération. En l'absence de YAP dans le noyau, RX1 peut alors activer la transcription des gènes responsables de la différenciation des photorécepteurs. D'après (Asaoka et al., 2014).

dans des cellules de rétinoblastomes en culture semble également modifier la répartition des cellules dans le cycle cellulaire (Brodowska et al., 2014). Alors que le phénotype de gain de fonction de *Yap* semble clairement aboutir à un retard dans la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens, les effets de la perte de fonction sur le cycle cellulaire sont plus difficiles à interpréter. L'inhibition de *Yap* semble bien perturber la progression du cycle cellulaire mais les données de la littérature ne permettent pas aujourd'hui d'identifier précisément les mécanismes impliqués.

Effets sur la différenciation des cellules de l'EPR et de la rétine

Le retard de la sortie de cycle observé dans un contexte de gain de fonction *Yap* a pour conséquence de perturber les processus de différenciation des progéniteurs rétiniens.. La perte de fonction du gène *Mst2* ou au contraire la surexpression de *Yap* entraîne des défauts de pigmentation de l'œil suggérant une perturbation de la différenciation des cellules de l'EPR (Asaoka et al., 2014). Cette même équipe a également observé que la surexpression de *Yap* inhibe l'expression de facteurs de transcription comme *otx5* ou *crx.* Ces facteurs sont connus comme jouant un rôle important dans la différenciation des photorécepteurs en régulant positivement l'expression de la *rhodopsine* (Figure 64). L'observation d'une interaction physique entre YAP et RX1 suggère que ce complexe pourrait être à l'origine du contrôle de la balance prolifération/différenciation des photorécepteurs (Asaoka et al., 2014).

Effets sur la survie cellulaire

Alors que le complexe YAP/TEAD joue un rôle essentiel dans la survie des cellules dans le tube neural en développement, la situation dans la rétine est moins claire. Dans la rétine de souris, l'inhibition du gène *Yap* augmente de façon très modeste le nombre de cellules en apoptose (Huanqing Zhang et al., 2012). De façon plus surprenante, la voie de signalisation Hippo semble être spécifiquement impliquée dans la survie de certaines cellules différenciées comme les photorécepteurs. En utilisant un modèle expérimental mimant un détachement de la rétine caractérisée par la mort des photorécepteurs, les auteurs ont montré que l'inhibition de la kinase MST2 (mais pas MST1) pouvait réduire significativement ce phénotype (Matsumoto et al., 2014).

Effets sur la spécification des progéniteurs rétiniens

Chez la drosophile, la spécification des différentes régions du disque imaginal de l'œil et de l'antenne semble faire intervenir le tri-complexe YKI-SD-HTH (Zhang et al., 2011). Bien que la voie Hippo soit principalement impliquée dans des mécanismes régulant la balance prolifération/différenciation dans un contexte de croissance, elle semble également jouer un rôle dans la spécification des cellules post-mitotiques (Mikeladze-Dvali et al., 2005)(Jukam & Desplan, 2011)(Jukam et al., 2013). Une équipe a ainsi montré que *Yki* est impliqué dans la différenciation terminale en sous-types cellulaires des photorécepteurs chez la drosophile (Jukam et al., 2013).

2.3 Rôles des effecteurs de la voie Hippo dans les autres tissus de l'œil

Enfin, la survie et la différenciation d'autres tissus de l'œil sont également perturbées lors de l'inhibition de la voie Hippo. Par exemple, la délétion de *Mer* dans l'ectoderme présomptif du cristallin chez la souris provoque des défauts de différenciation des fibres associés à un retard de sortie de cycle cellulaire et une augmentation de la mort cellulaire (Wiley et al., 2010). En accord avec ces résultats, un phénotype opposé est observé après une perte de fonction du gène *Yap* (Song et al., 2014).

2.4 Conclusion

Les données de la littérature sur les deux effecteurs de la voie Hippo dans l'œil sont très récentes mais suggèrent déjà qu'ils jouent des rôles essentiels dans cet organe, aussi bien dans la rétine que dans l'EPR ou le cristallin. Malgré tout, il est encore difficile de comprendre les rôles physiologiques de ces facteurs dans ce modèle en raison de la complexité et du manque de données sur les expériences de perte de fonction.

CHAPITRE III: OBJECTIF DE MON TRAVAIL DE THESE

La présence de cellules souches neurales adultes chez les mammifères offre des perspectives de thérapies cellulaires dans le cas de dégénérescence du tissu nerveux et a provoqué un véritable engouement dans le domaine de la biologie des cellules souches ces dernières années. Malgré cela, très peu de choses sont encore connues concernant les mécanismes moléculaires contrôlant toutes les caractéristiques spécifiques de ces cellules. Concernant les cellules souches de la rétine, de nombreux progrès ont été réalisés grâce à l'utilisation de modèles, comme les poissons ou les amphibiens, qui possèdent une population de cellules souches actives même chez l'adulte ainsi que des propriétés régénératives importantes. Ainsi, la rétine du xénope représente un excellent modèle dans le but d'étudier *in vivo* les mécanismes régissant l'activité des cellules souches durant le développement post-embryonnaire. L'ensemble des objectifs de mon projet détaillés ci-dessous a pour but de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien et la prolifération des cellules souches rétiniennes.

Objectif n°1: Etude de l'interaction entre les voies de signalisation Wnt et Hedgehog dans la rétine post-embryonnaire du xénope.

Comme décrit dans l'introduction, le modèle de la rétine du xénope a permis de mettre en évidence l'implication de certaines voies de signalisation dans la régulation de la prolifération et de la maintenance des cellules souches rétiniennes. Un des objectifs de mon projet de thèse a été d'étudier l'interaction entre ces différentes voies de signalisation déjà connues et étudiées par mon équipe d'accueil de façon indépendante. Ainsi, durant le début de ma thèse, j'ai eu la chance de participer à un projet mené par Caroline Borday, sur lequel j'avais déjà travaillé pendant un stage de licence réalisé au laboratoire. Ce projet nous a permis de mettre en lumière une partie du réseau de signalisation essentiel à la régulation des propriétés des cellules souches rétiniennes durant le développement post-embryonnaire.

Objectif n°2: Etude de la voie de signalisation Hippo dans la rétine post-embryonnaire du xénope.

L'avancée des travaux sur les interactions entre les voies Wnt et Hedgehog nous a également poussé à mettre en place un nouveau projet visant à agrandir ce réseau. La recherche de voies de signalisation susceptibles de s'intégrer au réseau Wnt/Hedgehog dans les cellules souches rétiniennes a conduit mon équipe d'accueil à s'intéresser à la voie de signalisation Hippo. En effet, de plus en plus de données de la littérature semblent indiquer que le rôle bien connu de cette voie de signalisation sur la croissance tissulaire pourrait être directement lié à un rôle de cette voie sur la maintenance et la prolifération des cellules souches. De plus, en 2011, au début de mon stage de Master sur le sujet, les publications de Fernandez-L *et al*. et de Varelas *et al.* suggéraient que cette voie pouvait interagir avec les voies Wnt et Hedgehog. La voie de signalisation Hippo représentait donc un candidat idéal même si aucunes données ne montraient alors que les composants de cette voie étaient bien exprimés au sein de la rétine du xénope. Depuis l'identification de la voie Hippo, le nombre de publication à son propos ne cesse d'augmenter. Pourtant, malgré l'engouement des recherches, les données bibliographiques concernant le rôle de cette voie dans les cellules souches neurales sont très limitées et concernent uniquement la régulation des cellules souches neurales durant le développement embryonnaire. Ainsi, le deuxième axe de recherche de mon projet de thèse a été d'étudier le rôle de cette voie dans les cellules souches de la rétine durant le développement post-embryonnaire. Enfin, étant donné que YAP n'agit pas seul pour activer la transcription des gènes cibles de la voie, mon troisième axe de recherche a été d'identifier son ou ses partenaires dans la rétine du xénope. Sur cette partie, j'ai travaillé en collaboration avec Guillermo Vega Lopez, post-doctorant au laboratoire afin d'identifier les différents partenaires de YAP et de démontrer leurs interactions physiques et fonctionnelles dans notre modèle.

MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE IV: MATERIELS ET METHODES

J'ai fait le choix de rédiger une partie « matériels et méthodes » dans mon manuscrit afin de détailler certaines techniques non couramment utilisés dans les laboratoires de biologie du développement, présentant un protocole complexe ou spécifiquement mis au point dans mon laboratoire d'accueil. Les autres techniques utilisées sont décrites dans chaque article présenté dans la partie résultat de ce manuscrit.

1. EMBRYONS ET LIGNEE TRANSGENIQUE

Les embryons ont été obtenus par fécondation *in vitro* à partir des femelles *Xenopus laevis* du laboratoire. Pour cela, les femelles sont stimulées par une injection d'hormone gonadotrope chorionique la veille de la ponte. Les œufs fécondés destinés à la micro-injection sont ensuite traités avec une solution de cystéine 2% pH8.8 afin de détruire la gangue des embryons. La lignée transgénique rapportrice de l'activité Wnt est une lignée de *Xenopus tropicalis* (Thi et al., 2010). Cette lignée contient la séquence codante d'une eGFP déstabilisée sous la régulation d'un promoteur portant 8 copies d'une séquence de liaison au facteur de transcription TCF (Figure 65). Les embryons utilisés possèdent une unique copie du transgène.

2. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES

Des traitements pharmacologiques ont été utilisés afin d'activer ou inhiber les voies de signalisation Wnt, Hedgehog et Hippo. Les voies Wnt et Hedgehog peuvent être activées *in vivo* par la 6-bromoindirubine-3'-oxime (BIO; 20µM; Sigma) et la purmorphamine (100µM; Calbiochem) respectivement. Au contraire, l'utilisation de l'IWR-1 (50µM; Sigma) et de la cyclopamine (20µM; LC Laboratories) permet d'inhiber ces voies. Les drogues sont directement appliquées dans le milieu d'incubation des embryons durant une période de 24h, excepté pour BIO pour lequel une application d'une heure est suffisant. Les embryons traités avec cette drogue sont donc laissés 23h dans leur milieu d'élevage avant leur fixation. Toutes les drogues sont diluées dans du DMSO. Concernant la perturbation de la voie Hippo, nous avons utilisé un inhibiteur de l'interaction YAP-TEAD, la vertéporfine (Liu-chittenden et al., 2012)(VP, Novartis). Cette drogue, diluée dans l'eau, est directement injectée dans le vitellus des embryons (20mg/kg).

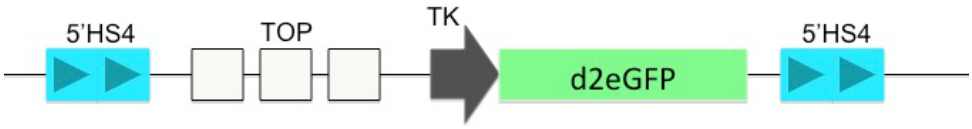


Figure 65: Schéma de la construction "pbin8LefdGFP" rapportrice de l'activité Wnt.

3. Morpholinos et Photo-Morpholinos inductibles

Les oligonucléotides morpholinos anti-sens suivants, spécifiquement produits pour s'hybrider dans la région 5'UTR des transcrits correspondants, ont été utilisés (Gene Tools):

- *Yap*-MO: 5' TAGGAGACTGTGGGTCACTTCACCA 3'-Lissamine

- *Pknox1*-MO: 5' ATGATACACTGCCCCTTGGCCTTTC 3'-Lissamine

- *Yap*-AS-photo-MO: 5' TAGGAGACTGTGPGTCACTTCACC 3'

- *Yap*-S-photo-MO: 5' TGAAGTGACPCACAGTCTCC 3'

Les MO suivants ont été utilisés comme contrôle:

- Std-MO: 5' CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3'

- *Yap* 5MM-MO (Ctrl1): 5' TAGCAGAGTGTGGCTCAGTTCACGA 3'-Lissamine

- *Pknox1* 5MM-MO (Ctrl2): 5' ATCATAGACTGCCCGTTGCCCTTTG3'-Lissamine

Le protocole d'utilisation des photo-MO chez le xénope a été mis au point au laboratoire par G. Vega Lopez et moi même selon le protocole publié chez le poisson zèbre (Tallafuss et al., 2012). La destruction des morpholinos inductibles est réalisée grâce à un traitement des embryons aux UV (365nm) durant 10min à l'aide d'un récipient en verre entouré de papier aluminium. L'injection du MO "sens" (*Yap1*-S-photo-MO) et du MO *Yap1* (*Yap1*-MO) a été réalisé en suivant un ratio 0.9:1.

4. Incorporation des analogues de la thymidine

L'EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)(1mM, Invitrogen), le BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) (10mM, Sigma) sont injectés en excès directement dans l'abdomen des embryons anesthésiés à l'aide d'une solution de MS222 (0.4g/L). Le temps d'incorporation varie selon les expériences réalisées. L'EdU a également été utilisé directement en bain dans le milieu d'incubation des embryons (1mM dilué dans du MBS 0.1X) dans les expériences d'EdU cumulatif (voir protocole EdU cumulatif). L'EdU est ensuite révélé sur coupe grâce à l'utilisation d'un kit n'utilisant aucun anticorps (Click-it EdU imaging kits, Invitrogen). La révélation de l'incorporation du BrdU

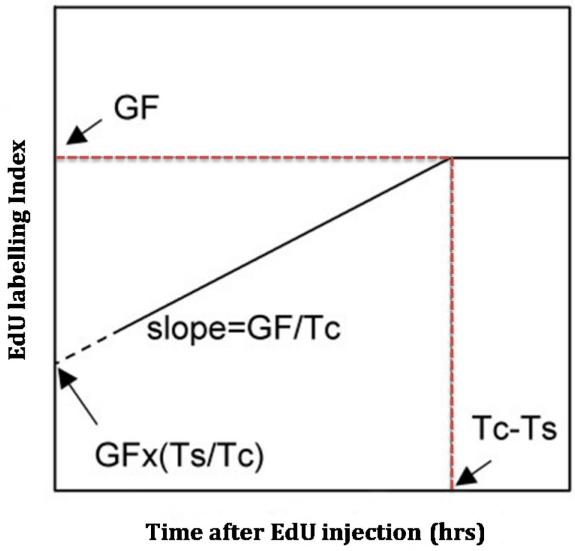


Figure 66: Graphique obtenu après une expérience d'EdU cumulatif. Abréviations utilisées, GF: "growth fraction" (proportion de cellules en prolifération), T_C: durée total du cycle cellulaire, T_S: durée de la phase S.

a été réalisée en utilisant un anticorps anti-BrdU (1:100, Becton Dickinson).

5. ANALYSE DES PARAMETRES DU CYCLE CELLULAIRE

Les techniques utilisées pour étudier le cycle cellulaire *in vivo* sont relativement complexes puisque dans ce cas, les cellules cyclent de manière asynchrone. Elles utilisent toutes le même principe selon lequel la fraction de cellules dans une phase donnée du cycle cellulaire est proportionnelle à la longueur de cette phase par rapport à la durée totale du cycle (Nowakowski 1989). Ces techniques utilisent donc des marqueurs des différentes phases du cycle: un analogue de la thymidine qui s'incorpore durant la phase S du cycle cellulaire et un marqueur des cellules en mitose, le phospho-histone H3 (P-H3).

1) L'indice mitotique

L'indice mitotique correspond au pourcentage de cellules en phase M, marqué par un anticorps anti-P-H3, au sein de la population de cellules en prolifération. Comme décrit précédemment, le nombre de cellules en phase M (N_m) par rapport au nombre total de cellules en prolifération (N_t) est proportionnel à la durée de la phase M (T_M) par rapport à la longueur totale du cycle cellulaire (T_C): $\frac{Nm}{Nt} \propto \frac{TM}{Tc}$

Dans notre cas, la réalisation d'une expérience d'un EdU cumulatif en parallèle nous a permis de montrer une augmentation de plusieurs heures de la T_C en condition de perte de fonction *Yap*. La durée de la phase M étant assez courte chez les embryons contrôles, une diminution de cette phase n'est pas suffisante pour expliquer à elle seule ce résultat. Ainsi, la variation de l'indice mitotique observée reflète donc une variation de la durée du cycle cellulaire.

2) L'EdU cumulatif

La technique de l'EdU cumulatif est une méthode permettant de calculer la longueur totale du cycle cellulaire d'une population donnée ainsi que la durée de la phase S. L'analyse de la proportion de cellules EdU^+ au sein de la population en fonction du temps d'incorporation permet d'obtenir une courbe comme représentée sur la figure 66. Les têtards sont injectés avec de l'EdU puis laissés dans un milieu contenant de l'EdU durant des temps croissants, allant de 30min à 72h. La proportion de cellules EdU^+ augmente de façon linéaire durant les premiers temps d'incorporation puis atteint un plateau correspondant à la GF (Growth Fraction), la

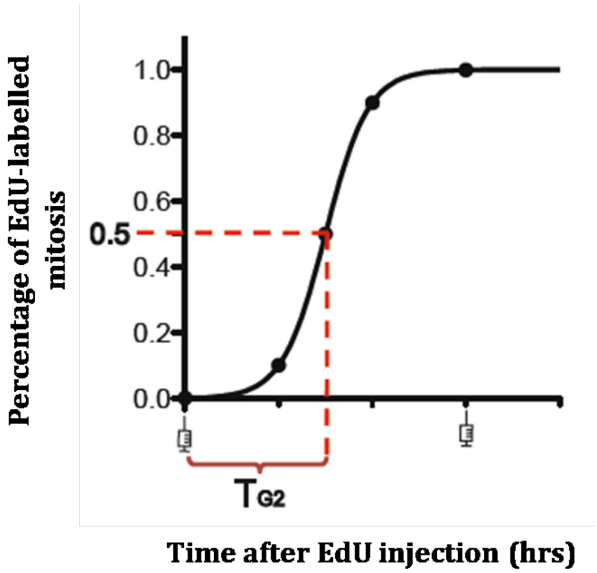


Figure 67: Graphique obtenu après une expérience de PML. T_{G2}: durée moyenne de la phase G2.

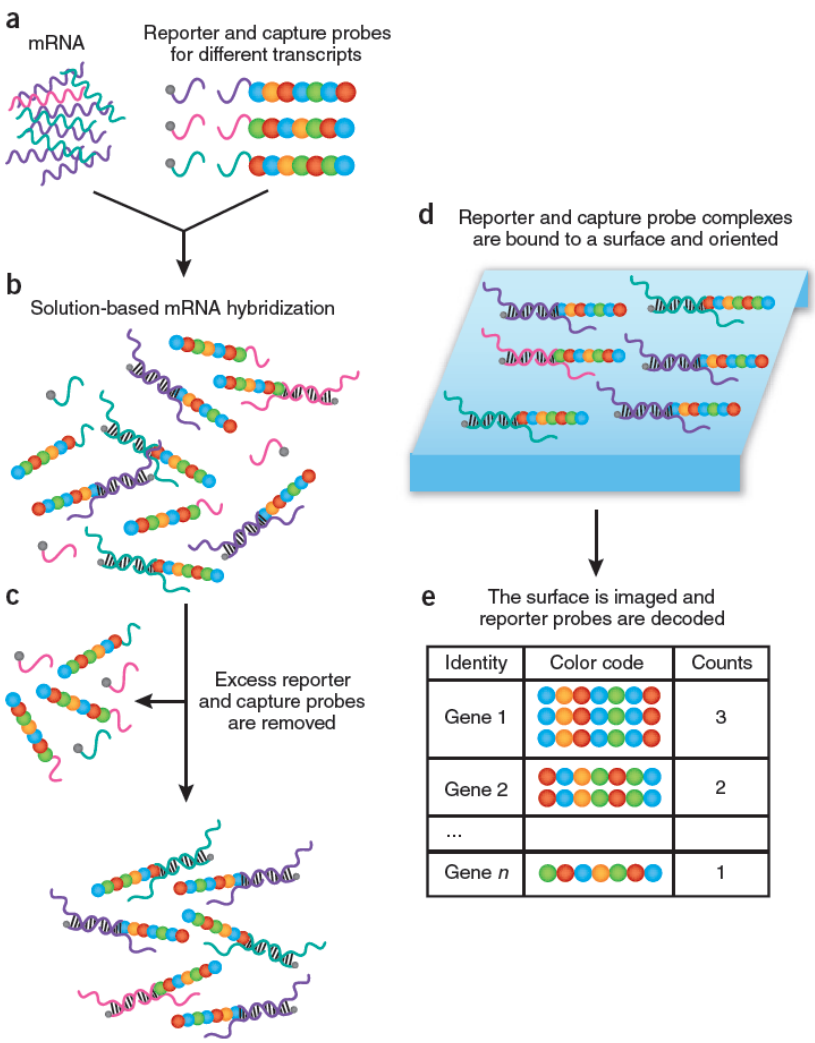


Figure 68: Technique du "Nanostring".

proportion de cellules en prolifération au sein de la population étudiée. Le temps pour lequel le plateau est atteint correspond à la différence entre la longueur du cycle cellulaire et la durée de la phase S (T_C-T_S). La proportion de cellules EdU^+ au temps t=0 est égale à $\frac{Ts}{Tc}$ x GF. Ainsi, ces deux équations à deux inconnues permettent de calculer les valeurs de T_C et de T_S.

Dans notre expérience, les courbes permettant de calculer la T_C et la T_S ont été tracées en utilisant la feuille de calcul Excel fournie par le Pr. Richard Nowakowski (Nowakowski et al. 1989). Cette dernière est basée sur une analyse mathématique qui permet d'ajuster le traçage des courbes à partir des données expérimentales obtenues.

3) La PLM ("Percentage of Labelled Mitotic index")

La technique de l'EdU cumulatif associée à un marquage P-H3 dans le but d'identifier les cellules en phase M permet de calculer la longueur de la phase G2 du cycle cellulaire. Dans ce cas, l'analyse de la proportion de cellules EdU+/P-H3+ en fonction du temps d'incorporation permet d'obtenir une courbe comme représentée sur la figure 67. Le temps nécessaire pour atteindre un pourcentage de cellules EdU+/P-H3+ de 50%, correspondant au temps pour lequel la moitié des cellules sont passées par la phase S et la phase G2, représente la moyenne de la durée de la phase G2 de la population étudiée.

4) Calcul du T_{G1} et du T_M

Pour finir, la durée de la phase M (T_M) est calculée après détermination de l'indice mitotique, du T_C et de la GF selon la formule suivante: T_m= indice mitotique x GF x T_C

Enfin, la durée de la phase G1 (T_{G1}) peut être déduite grâce à la formule T_{G1}= T_C-(T_{G2}+T_M+T_S).

6. Experience de "Nanostring"

La technique du Nanostring est basée sur l'utilisation de deux sondes spécifiques des cibles que l'on souhaite étudier. La première sonde est une sonde de capture, couplée à la biotine, qui permet d'immobiliser les molécules d'intérêt sur un support dédié au comptage. La deuxième sonde synthétisée est spécifique de la molécule d'intérêt et est couplées à un code barre constitué de 6 fluorochromes de couleurs différentes (Figure 68). Suivant ce principe, nous

Gene name			
Areg/IMAGE_8635351	EB739192.1	lats2	RETINA_001.1
Cyr61	NM_001086439.1	lef1	NM_001088655.1
FoxP2	NM_001095669.1	mcm3/zmcm3	NM_001086689.1
STK3/mst2	NM_001091664.1	mcmbp	NM_001087089.1
STK4/mst1	NM_001089968.1	meis1	NM_001090635.1
TCF3	NM_001086199.1	merlin/NF2	NM_001093488.1
alpl	NM_001087426.1	mgrn1	NM_001090089.1
atoh7-a	NM_001085820.1	mitf	AY190598.1
aurka	NM_001088096.1	mki67/ki67	NM_001135081.1
axin2	NM_001094372.1	mycn-b	NM_001171989.1
bcl2l1/xR11/bclxl	NM_001088678.1	ncapg	NM_001088387.1
bdnf-a	X61477.1	neurog2-a	NM_001088333.1
birc2/c-iap1	NM_001093264.1	nop58-a	NM_001093159.1
birc5.1b/survivin1	NM_001088881.1	p17Xic3	AY573848.1
birc5.2b/survivin2	NM_001088943.1	pcna	NM_001087542.1
birc7-a/livin/ml-iap	NM_001088821.1	pknox1	NM_001096382.1
ccna2/cyclin A2	NM_001096243.1	pou4f1/Brn3a	AF196575.1
ccnb1/cyclin B1	NM_001088520.1	pou5f1.2/xoct-91/oct4	NM_001087873.1
ccnd1-a/cyclin D1	NM_001086776.1	ptch1	NM_001088613.1
ccnd2-b/cyclin D2	NM_001096348.1	ranbp1	NM_001086295.1
ccne1/cyclinE	NM_001087977.1	rax-a	NM_001088218.1
cdc25c-a	NM_001087787.1	rho	NM_001087048.1
cdk1b/p34cdc2/cdc-2	NM_001086624.1	rlbp1/cralbp	NM_001086917.1
cdk2	NM_001090651.1	sfrp1	NM_001087488.1
cdkn1a/ p16Xic2	AY573849.1	sfrp2	NM_001087194.1
cdkn2d/ink4d/p19	NM_001093415.1	shh	NM_001088313.1
cdknx/ p27XIC1	NM_001088319.1	slc17a7/glut1	NM_001089635.1
chx10/VSX1	BC044049.1	smo	NM_001088615.1
cmyc	NM_001085896.1	spry4	BJ032161.1
ctgf	NM_001088228.1	ssbp1-a	NM_001101771.1
ddx39a	NM_001086154.1	taz	NM_001086103.1
dhh-a	NM_001085791.1	tead1	NM_001110754.1
dnajc27-a	NM_001087293.1	tead4	NM_001094370.1
fgf1	NM_001092788.1	tle2	NM_001088355.1
fgf8	NM_001090435.1	tp53/p53	NM_001088098.1
foxO4	NM_001161398.1	trmt2a	NM_001099875.1
fzd5	NM_001085748.1	tubb2b/N-tub	NM_001086064.1
gad1	NM_001085801.1	ventx1.2	NM_001097921.1
gli1	U57454.1	ventx2.1-b	NM_001087981.1
gli2	NM_001088425.1	wnt2b-a	NM_001085810.1
gli3	NM_001087971.1	wnt8b	NM_001090285.1
gxylt1	NM_001096123.1	wnt9b	GQ150814.1
hes1-a	NM_001087927.1	xiap/Birc4	NM_001095614.1
hes4-b	NM_001088692.1	yap	NM_001246307.1
hey1/hrt1	NM_001090457.1	zic5	NM_001085657.1
id2	NM_001088433.1	H4	NM_001094457.1
id3-a	NM_001086066.1	gapdh	NM_001087098.1
ihh	NM_001085793.1	odc	NM_001086698.1
kpnb1	NM_001114843.1		
lats1	NM_001094369.1		

Figure 69: Liste des gènes cibles analysés dans les expériences de Nanostring.

avons analysé l'expression de plus de 90 gènes cibles en condition de perte de fonction *Yap* (Figure 69). L'extraction des ARNm a été réalisée à partir de têtes de têtards injectés avec un MO contrôle ou le MO *Yap1* au stade deux cellules. La première étape consiste en l'hybridation des sondes préalablement conçues sur l'échantillon d'ARN à tester Les complexes sondes-cibles sont ensuite alignés et immobilisés sur une lame spécifique afin d'être lus par un système optique capable d'identifier les codes-couleur ("nCounter")(Figure 68).

RESULTATS

Chapitre V: Etude du réseau génique contrôlant la maintenance des cellules souches de la rétine post-embryonnaire: interaction des voies de signalisation Wnt-Hedgehog.

Chapitre VI: Analyse fonctionnelle de *Yap* dans les cellules souches et les progéniteurs de la rétine post-embryonnaire.

CHAPITRE V : RESEAU GENIQUE CONTRÔLANT LA MAINTENANCE DES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE POST-EMBRYONNAIRE : INTERACTION DES VOIES DE SIGNALISATION WNT/HEDGEHOG

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Avant mon arrivée au laboratoire, mon équipe d'accueil avait déjà consacré une partie de ses recherches à l'étude des voies de signalisation Wnt et Hedgehog sur le comportement des cellules souches et des progéniteurs rétiniens de façon indépendante. Concernant la voie de signalisation Hedgehog, *Smo*, *Gli2* et *Gli3* ont été décrit comme étant des marqueurs des cellules souches de la rétine post-embryonnaire chez le xénope (Perron et al. 2003). Les résultats de l'équipe montre que cette voie joue un rôle ambivalent dans le contrôle du cycle cellulaire en modulant à la fois sur la cinétique et la sortie du cycle cellulaire des précurseurs rétiniens durant l'embryogenèse chez le xénope (Locker et al., 2006). A ce stade, la voie Hedgehog est donc capable d'activer à la fois la prolifération et la différenciation des précurseurs de la rétine. Le modèle imaginait alors proposait que la voie Hedgehog pourrait être responsable de la transition des cellules souches, possédant un cycle cellulaire lent, en cellules progénitrices, qui acquièrent un cycle cellulaire plus rapide avant d'entamer leur différenciation. L'étude de la voie de signalisation Wnt a montré que son activation était capable de stimuler la prolifération des cellules de la ZMC en retardant leur sortie du cycle cellulaire (Denayer et al., 2008). Malgré tout, il était difficile de comparer ces données à celle de la voie Hedgehog étant donné que les stades de développement analysés ainsi que les protocoles de modulation des voies de signalisation utilisés étaient très différents. Les données de la littérature sur ces deux voies dans le cerveau adulte montrent qu'elles semblent posséder des fonctions mitogènes au sein des zones de neurogenèse post-embryonnaire. Cependant, leur interaction fonctionnelle n'avait encore jamais été étudiée. De plus, les données de la littérature concernant l'interaction entre ces deux voies au cours du développement étaient complexes et décrivaient des résultats très différents selon les contextes cellulaires. Ces deux voies peuvent en effet agir à la fois de façon synergique dans certains tissus et de manière antagoniste dans d'autres (Day & Yang 2008)(Campbell et al., 2008)(Alvarez-Medina et al., 2009).

Dans ce contexte, Caroline Borday a entrepris le projet d'étudier l'interaction entre ces deux voies dans le contrôle de la prolifération des cellules souches et des progéniteurs de la rétine post-embryonnaire. Ce projet auquel j'ai pu activement participer durant mes différents stage de L2, de Master et durant la première partie de ma thèse visait à comprendre comment les voies de signalisation Wnt et Hedgehog agissent et se coordonnent afin de contrôler l'équilibre prolifération/différenciation des cellules souches de la rétine post-embryonnaire.

Publication associée à ce chapitre:

(2012) Borday C, **Cabochette P**, Parain K, Mazurier N, Janssens S, Tran HT, Sekkali B, Bronchain O, Vleminckx K, Locker M, Perron M. Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation. ***Development*** 139(19) :3499-509.

2. RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS

1) Effets de la perturbation des voies Wnt et Hedgehog sur la prolifération dans la rétine post-embryonnaire

Compte tenu des données de la littérature montrant que les voies Wnt et Hedgehog possèdent une activité mitogène dans le cerveau adulte, la première étape de ce projet a été de confirmer cette fonction au sein de notre modèle. Pour cela, nous avons utilisé différents agents pharmacologiques ,que j'ai mis au point *in vivo* chez le xénope, dans le but de perturber les voies Wnt et Hh et d'analyser ensuite les effets de ces perturbations sur l'incorporation de BrdU. Comme attendu, l'activation de la voie Wnt entraîne bien une augmentation du nombre de cellules BrdU positives au sein de la ZMC alors qu'au contraire, son inhibition réduit cette incorporation. De façon surprenante, l'activation de la voie Hedgehog aboutit à un phénotype similaire à celui obtenu après une inhibition de la voie Wnt et son inhibition augmente au contraire le nombre de cellules BrdU positives dans la ZMC. De plus, l'ensemble des combinaisons étudiées d'activation ou d'inhibition simultanées montre que ces deux voies ont des effets opposés sur la prolifération et que les phénotypes générés par l'activation d'une voie sont abolis par la co-activation de l'autre. Ces résultats nous ont donc permis de conclure

que, contrairement à leurs activités mitogènes mis en évidence de façon indépendante dans le cerveau adulte, les voies Wnt et Hedgehog ont des effets totalement opposés sur la prolifération cellulaire dans la rétine post-embryonnaire chez le xénope.

2) Détermination des territoires d'expression des ligands Wnt et Hedgehog

Dans le but d'étudier le rôle physiologique des voies Wnt et Hedgehog et de savoir si leurs effets opposés sur la prolifération des cellules de la ZMC pourrait refléter une éventuelle régulation endogène, Caroline Borday a ensuite cherché à identifier les sources de ligands Wnt et Hedgehog dans la rétine post-embryonnaire chez le xénope. Les résultats montrent que les ligands Wnt (*Wnt2b,Wnt3a*, *Wnt7b*, *Wnt8b*, *Wnt9a*, *Wnt9b* et *Wnt16*) s'expriment à proximité de la niche des cellules souches de la rétine, alors qu'au contraire, les ligands Hedgehog (*Shh, Ihh* et *Dhh*) s'expriment dans des territoires complètement exclusifs, situés plus centralement au sein de la rétine post-embryonnaire. Les morphogènes Wnt et Hedgehog émanent donc des pôles opposés de la ZMC suggèrant que de potentiels gradients opposés pourraient exister au sein de cette zone.

3) Effets des voies Wnt et Hedgehog sur leur activité réciproque

Dans le but de d'étudier les interactions fonctionnelles entre les voies Wnt et Hedgehog, la stratégie expérimentale utilisée a consisté à perturber l'activité d'une des voies et d'analyser les conséquences sur l'activité de l'autre. La modulation des voies de signalisation Wnt et Hedgehog a été réalisée grâce à l'utilisation d'outils génétiques et pharmacologiques. Les résultats de cette partie ont montré que les voies de signalisation Wnt et Hedgehog ont des impacts opposés l'une sur l'autre. En effet, l'activation de la voie Wnt inhibe l'expression des cibles transcriptionnelles de la voie Hedgehog alors qu'au contraire, l'activation de la voie Hedggehog réprime l'expression d'un gène rapporteur de l'activité Wnt dans des animaux transgéniques. L'inhibition réciproque de ces deux voies appuie donc fortement l'hypothèse de l'existence de deux gradients opposés au sein de la niche des cellules souches de la rétine post-embryonnaire.

4) Identification des acteurs moléculaires à l'origine de l'inhibition réciproque des voies Wnt/Hedgehog

Enfin, la dernière partie de ce projet a eu pour but d'identifier les mécanismes moléculaires à l'origine de cette régulation qui relient fonctionnellement les voies de signalisation Wnt et Hedgehog. Les résultats mettent en évidence deux acteurs essentiels à cet antagonisme mutuel, les facteurs *Sfrp1* (inhibiteur de la voie Wnt) et *Gli3* (répresseur de la voie Hedgehog). *Sfrp1* est un gène cible de la voie Hedgehog nécessaire à sa fonction inhibitrice sur la voie Wnt alors que *Gli3* est essentiel à la voie Wnt pour réprimer la voie de signalisation Hedgehog.

3. CONCLUSIONS

L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence les activités antagonistes des voies de signalisation Wnt et Hedgehog sur l'activité proliférative des cellules de la ZMC. Ces résultats suggèrent que les fonctions antagonistes de ces deux voies pourraient être responsables de la fine régulation du niveau de prolifération des cellules de la ZMC et sont donc des composants clés de la niche des cellules souches de la rétine post-embryonnaire.

Article n°1

Caroline Borday*, Pauline Cabochette*, Karine Parain, Nicolas Mazurier, Sylvie Janssens, Hong Thi Tran, Belaïd Sekkali, Odile Bronchain, Kris Vleminckx, Morgane Locker, Muriel Perron (2012)

Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation.

Development

Development 139, 3499-3509 (2012) doi:10.1242/dev.079582
© 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

Antagonistic cross-regulation between Wnt and Hedgehog signalling pathways controls post-embryonic retinal proliferation

Caroline Borday[1,*], Pauline Cabochette[1,*], Karine Parain[1], Nicolas Mazurier[1], Sylvie Janssens[2], Hong Thi Tran[2], Belaïd Sekkali[2], Odile Bronchain[1], Kris Vleminckx[2], Morgane Locker[1] and Muriel Perron[1,‡]

SUMMARY

Continuous neurogenesis in the adult nervous system requires a delicate balance between proliferation and differentiation. Although Wnt/β-catenin and Hedgehog signalling pathways are thought to share a mitogenic function in adult neural stem/progenitor cells, it remains unclear how they interact in this process. Adult amphibians produce retinal neurons from a pool of neural stem cells localised in the ciliary marginal zone (CMZ). Surprisingly, we found that perturbations of the Wnt and Hedgehog pathways result in opposite proliferative outcomes of neural stem/progenitor cells in the CMZ. Additionally, our study revealed that Wnt and Hedgehog morphogens are produced in mutually exclusive territories of the post-embryonic retina. Using genetic and pharmacological tools, we found that the Wnt and Hedgehog pathways exhibit reciprocal inhibition. Our data suggest that Sfrp-1 and Gli3 contribute to this negative cross-regulation. Altogether, our results reveal an unexpected antagonistic interplay of Wnt and Hedgehog signals that may tightly regulate the extent of neural stem/progenitor cell proliferation in the *Xenopus* retina.

KEY WORDS: Neural stem cells, Retina, Wnt and Hedgehog signalling

INTRODUCTION

Neural stem cells (NSCs) proliferate and generate new neurons throughout the lifetime in neurogenic areas of the adult brain. Identifying microenvironmental cues that tightly control their self-renewal, proliferation and lineage decisions is crucial for the development of novel therapies in regenerative medicine. Among key diffusible factors, Sonic hedgehog (Shh) is thought to be involved in adult NSC maintenance and proliferation control (Ahn and Joyner, 2005; Balordi and Fishell, 2007; Han et al., 2008; Lai et al., 2003; Machold et al., 2003; Palma et al., 2005; Po et al., 2010). The canonical Wnt pathway has also proven to be an important regulator of proliferation and neurogenesis in adult hippocampal or subventricular zones (Adachi et al., 2007; Kuwabara et al., 2009; Lie et al., 2005). Thus, both signalling pathways seem to share a mitogenic function within these neurogenic niches of the adult nervous system. However, whether the two pathways establish functional interactions in this context has not been addressed. To date, this issue has only been investigated during embryonic development. A recent study reported that these pathways cooperate in the developing spinal cord to coordinately regulate neural cell cycle progression (Alvarez-Medina et al., 2009). This clearly contrasts with the situation described in the midbrain in which Shh repression by Wnt signalling is required for floor plate neurogenesis (Joksimovic et al., 2009). Therefore, despite the vast literature on Wnt and Hedgehog mitogenic effects, the nature of their interactions is difficult to predict and clearly deserves further investigation.

Here, we have addressed this issue in the mature retina by taking advantage of the paradigmatic *Xenopus* ciliary marginal zone (CMZ), a region with active NSCs in its most peripheral region that allows continuous retinal growth during adulthood (Wetts et al., 1989; Perron et al., 1998; Cerveny et al., 2011). It was recently demonstrated that these cells in the fish retina are indeed genuine multipotent stem cells (Centanin et al., 2011). We previously showed that canonical Wnt signalling is required to maintain cell proliferation within the CMZ (Denayer et al., 2008). In addition, we found that the Hedgehog pathway has dual functions during retinogenesis, simultaneously promoting cell cycle progression as well as withdrawal of embryonic retinal progenitors (Agathocleous et al., 2007; Locker et al., 2006). Altogether, this precludes a straightforward prediction of how retinal stem/progenitor cells integrate the two signals within the CMZ. Here, we discovered that altering the two pathways leads to opposite proliferative responses. This functional antagonism correlates with non-overlapping production sites of the corresponding morphogens. We also demonstrated that Wnt and Hedgehog signalling pathways restrain each other's activity through the transcriptional regulation of *Gli3* and *Sfrp-1*. We propose a model in which the antagonistic interplay of Wnt and Hedgehog signals, emanating from opposite sides of the CMZ, controls the fine-tuning of post-embryonic proliferation in the retina.

MATERIALS AND METHODS

Embryo collection and transgenic lines

Xenopus laevis embryos were obtained by conventional methods of hormone-induced egg laying and in vitro fertilisation, and staged according to Nieuwkoop and Faber's table of development (Nieuwkoop and Faber, 1994). Transgenic *Xenopus tropicalis* carrying the Wnt reporter construct pbin8LefdGFP have been described previously (Tran et al., 2010). Briefly, the transgene, flanked by chromosomal insulator sequences, contains a synthetic promoter harbouring eight copies of an optimal binding sequence for LEF/TCF upstream of a destabilised eGFP. *X. tropicalis* transgenic embryos were obtained by natural fertilisation between a wild-type female

[1]Université Paris-Sud, UPR CNRS 3294, 91405 Orsay, France. [2]Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, B-9052 Ghent, Belgium.

*These authors contributed equally to this work
‡Author for correspondence (muriel.perron@u-psud.fr)

Accepted 12 July 2012

and a transgenic male. The latter was selected beforehand as having a single transgene insertion site (as inferred by mendelian ratios in its progeny) in order to ensure homogeneous levels of GFP expression in the offspring.

Construction of the LEF1-VP16 and LEF1-EnR transgenesis vectors has been described previously (Denayer et al., 2008) and transgenic *X. tropicalis* lines (LEF1-VP16Tg and LEF1-EnRTg) were generated as described (Sekkali et al., 2008). These constructs are fused with the dexamethasone-responsive hormone-binding domain of the human glucocorticoid receptor (GR).

Expression constructs and morpholinos

pCS2-TCF3-VP16GR and *pCS2-dnTCF3-GR* (de Croze et al., 2011), *pCS2-Ihh-CD2* [previously called *Bhh* (Locker et al., 2006)], *pCS2-Smo-M2* (Koebernick et al., 2003), *pCS2-cyclinA2* and *pCS2-cdk2* (Decembrini et al., 2006) and *pCS2-GFP* (a gift from David Turner, University of Michigan, Ann Arbor, USA) were described previously. *pCS2-Shh-CD2* and *pCS2-Dhh-CD2* (previously called *Chh*) were generated by subcloning the N-terminal coding regions (devoid of the C-terminal cleavage product) of *Shh* and *Dhh* cDNAs (Ekker et al., 1995) into a *pCS2-CD2* vector (Locker et al., 2006) after PCR amplification. *Gli3* and *Sfrp-1* morpholino (Mo) sequences are shown in supplementary material Fig. S1.

Microinjection and in vivo DNA lipofection

Capped mRNAs encoding TCF3-VP16GR and GFP were transcribed from pCS2 plasmids after *Not*I digestion using the mMessage mMachine SP6 Kit (Ambion). Then, 400 pg of each mRNA was injected into two blastomeres of four-cell stage embryos. *Gli3*, *Sfrp-1* or standard control morpholino oligonucleotides (Gene Tools) were injected into one blastomere at the one-cell stage (30 ng). Their efficacy was tested by analysing in vivo GFP fluorescence following co-injection of a chimeric *GFP* construct fused downstream of the morpholino-complementary sequence (supplementary material Fig. S1).

Lipofection experiments were performed by cotransfecting the indicated *pCS2* constructs together with *pCS2-GFP* at stage 18 into the presumptive region of the retina, as previously described (Ohnuma et al., 2002). Tadpoles were fixed in 4% paraformaldehyde at stage 41 and cryostat sectioned (12 μm). GFP-positive cells were counted and cell types were identified based upon their laminar position and morphology.

Protein activity of GR chimeric constructs was induced by incubating the embryos/tadpoles for 24 hours in 4 μg/ml dexamethasone (DEX, Sigma) from stage 18 (lipofection experiments) or stage 28/30 (injection experiments, transgenic lines).

Pharmacological and recombinant SFRP-1 protein treatments

Cyclopamine (20-100 μM; LC Laboratories) or purmorphamine (100 μM; Calbiochem) was applied to the tadpole culture medium for 24 hours. BIO (6-bromoindirubin-3′-oxime, Sigma) and LiCl (Sigma) treatment conditions were adapted to tadpole stages based on the protocols of Meijer and collaborators (Meijer et al., 2003). Those for IWR-1 (Sigma) were adapted from published data on zebrafish (Chen et al., 2009). Concentrations used and drug treatment durations were: BIO, 50 μM for 1 hour; LiCl, 0.3 M for 5 minutes; IWR-1, 50 μM for 24 hours. Control tadpoles were exposed to equivalent dilutions of the corresponding drug solvent (ethanol or dimethyl sulphoxide). Recombinant chick SFRP-1 protein (R&D Systems and a gift from Paola Bovolenta) was described previously (Esteve et al., 2003). Wnt reporter transgenic tadpoles were immersed for 24 hours in 0.1× modified Barth's saline containing 3 ng/μl of the purified soluble SFRP-1 protein. Holes were made in the epidermis to facilitate the penetration of SFRP-1. For analyses at stage 41, drugs or recombinant proteins were applied 24 hours earlier, at stage 39. For analyses at stage 38 or 40 (*X. laevis* or *X. tropicalis*, respectively), they were applied at stage 28/30.

EdU/BrdU incorporation and immunohistochemistry

Tadpoles were injected intra-abdominally or immersed for 3 hours in a 10 mM BrdU solution (Sigma) and then fixed in 4% paraformaldehyde. For birthdating experiments, tadpoles were injected with 1 mM 5-ethynyl-20-deoxyuridine (EdU, Invitrogen) and subsequently incubated in a 1 mM EdU solution so that EdU would be constantly available. The solution was renewed daily. EdU incorporation was detected on paraffin sections using the Click-iT EdU Imaging Kit according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). Immunohistochemistry was performed on 12 μm cryostat sections as described (Perron et al., 2003), with mouse monoclonal anti-BrdU (1:100, Becton Dickinson), mouse monoclonal anti-GFP (1:500, Molecular Probes), rabbit polyclonal anti-CRALBP (1:1000; an anti-glia antibody provided by Jack Saari, University of Washington, Seattle, USA), mouse monoclonal anti-XAR1 (1:10; a gift from Donald Sakaguchi, Iowa State University, Ames, USA), mouse monoclonal anti-calbindin (1:100, Swant), mouse monoclonal anti-Islet1 (1:100, DSHB), and anti-mouse or anti-rabbit fluorescent secondary antibodies (1:1000, Alexa 488 or 594, Molecular Probes). Mouse monoclonal anti-PCNA (1:1000, Dako) was applied on 12 μm paraffin sections from tadpoles fixed in Bouin solution. Cell nuclei were counterstained with Hoechst (Sigma). Fluorescent staining was visualised with a Zeiss M2 microscope. Images were captured using an AxiocamMRc digital camera (Zeiss) and processed with AxioVision REL 7.8 (Zeiss) and Photoshop CS4 (Adobe) software.

In situ hybridisation

Digoxigenin-labelled antisense RNA probes were generated according to the manufacturer's instructions (DIG RNA Labeling Mix, Roche). Whole-mount in situ hybridisation was carried out as previously described (Perron et al., 2003). Embryos were then vibratome sectioned (50 μm).

Quantitative real-time PCR (qPCR)

Total RNA from 40-100 dissected retinas was isolated using the Aurum Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (BioRad) or the Nucleospin RNA XS Kit (Macherey Nagel). Reverse transcription was performed using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). qPCR reactions were performed in triplicate using SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad) on a C1000 thermal cycler (CFX96 real-time system, BioRad). Results were normalised against the expression of reference genes *ODC* and *RPL8* using CFX Manager software (BioRad). PCR primer sequences are listed in supplementary material Table S1.

Quantification and statistical analyses

At least six embryos per condition and per experiment were analysed. Following image capture, areas of the in situ hybridisation labelling in the CMZ were quantified using AxioVision REL 7.8 or Photoshop CS4. As the signal in the control condition can vary along the dorsoventral axis, quantification was systematically performed in both the dorsal and ventral CMZ. Numeration of BrdU-positive cells in the CMZ was performed by manual counting following delineation of the dorsal and ventral CMZ based on Hoechst staining. Changes in BrdU-positive cell number are presented as percentage increase/decrease relative to the average number found in control CMZ. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Hedgehog and Wnt pathways lead to opposite proliferative phenotypes during retinogenesis

As a first step to compare Wnt and Hedgehog involvement in retinal stem/progenitor cell behaviour, we activated each pathway during retinogenesis by in vivo lipofection and performed lineage analyses of transfected cells in the mature retina (Fig. 1, supplementary material Fig. S2). Canonical Wnt signalling activation was achieved by overexpressing a constitutively active form of TCF3 (TCF3-VP16GR) (Agathocleous et al., 2009), a transcriptional effector acting at the nuclear endpoint of the pathway. As previously shown (Agathocleous et al., 2009), forced *TCF3* expression in such assays leads to the maintenance of cells retaining a neuroepithelial morphology characteristic of retinal progenitors (Fig. 1A,C). Agathocleous and collaborators further demonstrated that these neuroepithelial cells are actively proliferating, consistent with a Wnt-induced delay in cell cycle

DEVELOPMENT

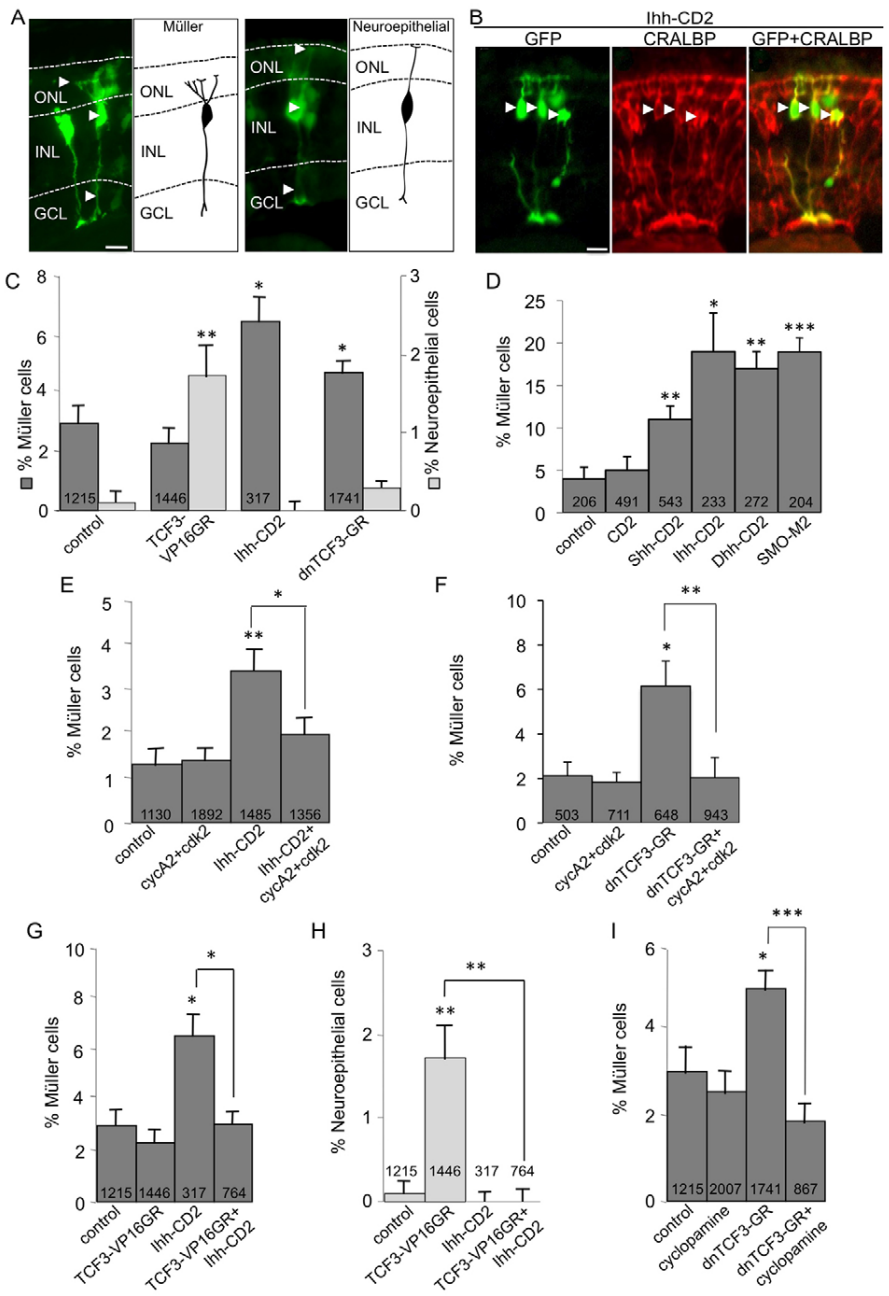


Fig. 1. Interfering with Hedgehog and Wnt pathways leads to opposite effects on precursor cell destiny during retinogenesis. (**A**,**B**) Stage 41 *Xenopus* retinal sections following in vivo lipofection. (A) The respective morphologies of GFP-positive Müller versus neuroepithelial cells. Arrowheads indicate the cell represented in the adjacent drawing. (B) Anti-CRALBP immunostaining (Müller cell marker; arrowheads) following Ihh-CD2 overexpression. (**C-I**) Percentage of Müller or neuroepithelial cells observed in stage 41 retinas following in vivo lipofection with the indicated constructs. Cyclopamine treatment was performed from stage 18 onwards on embryos lipofected with *GFP*. The total number of counted cells per condition is indicated in each bar. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 (Student's *t*-test). Mean ± s.e.m. ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars: 10 μm.

withdrawal (Agathocleous et al., 2009). We then lipofected *Ihh-CD2*, a construct that encodes a membrane-anchored Indian hedgehog (Ihh) protein, allowing for cell-autonomous activation of Hedgehog signalling (Locker et al., 2006). In contrast to the previous situation, *Ihh-CD2* overexpression did not enhance the proportion of neuroepithelial cells but instead induced a 3-fold increase in Müller glia (Fig. 1A,C), as confirmed by immunostaining using an anti-CRALBP antibody (Fig. 1B). A similar increase in the proportion of Müller cells was obtained upon misexpression of the two other Hedgehog ligands [Shh and Desert hedgehog (Dhh)] and of a constitutively active form of Smoothened called Smo-M2 (Fig. 1D).

Intriguingly, studies in *Xenopus* have revealed that overexpression of cyclin-dependent kinase inhibitors of the Cip/Kip (Ohnuma et al., 1999; Daniels et al., 2004) or INK (M. Agathocleous and M. Roussel, personal communication) families both pushes precursors out of the cell cycle and favours Müller cell genesis. In line with this, could the Hedgehog-dependent bias toward gliogenesis be linked in any way to the previously demonstrated ability of the pathway to promote precocious cell cycle exit (Locker et al., 2006)? We addressed this issue by counteracting *Ihh*-induced effects on cell cycle withdrawal through co-lipofection with *cyclinA2/cdk2*. These two cell cycle components are known, when co-overexpressed, to delay retinal cell birthdate without altering cell cycle kinetics (Decembrini et al., 2006). We indeed found that this rescued the Müller glia phenotype (Fig. 1E), leading to a retinal cell distribution indistinguishable from that observed in controls (supplementary material Fig. S3A). Importantly, the same held true following blockade of Wnt signalling: overexpression of a dominant-negative form of TCF3

DEVELOPMENT

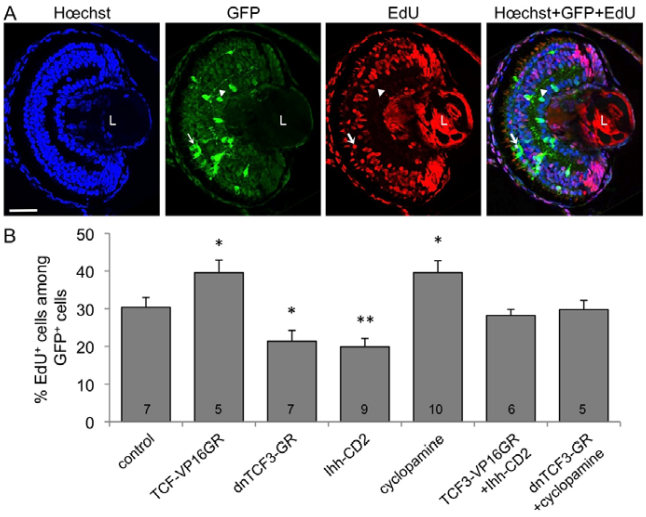


Fig. 2. Hedgehog and Wnt pathways have opposite impacts on cell cycle exit. Birthdating experiments (from stage 32 to stage 41) following in vivo lipofection with the indicated constructs. Cyclopamine treatment was performed from stage 18 onwards on embryos lipofected with *GFP*. Transfected cells that have exited the cell cycle before EdU exposure (stage 32) are EdU⁻ at stage 41, whereas cells that have exited the cell cycle at any time during the EdU incorporation period are EdU⁺. (**A**) Typical stage 41 retinal sections stained for GFP and EdU. The arrow and arrowhead point to a GFP⁺ EdU⁺ and to a GFP⁺ EdU⁻ cell, respectively. (**B**) Percentage of EdU⁺ nuclei among transfected cells. The total number of analysed retinas per condition is indicated in each bar. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ (Student's *t*-test). Mean ± s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μm.

(*dnTCF3-GR*) enhanced Müller cell genesis as previously shown with other constructs (Van Raay et al., 2005), and this effect was abolished upon co-lipofection with *cyclinA2/cdk2* (Fig. 1C,F, supplementary material Fig. S3B). We thus propose that the increased glial cell proportion induced by Hedgehog activation or Wnt inhibition results, at least in part, from precocious cell cycle exit.

We next examined whether Wnt signalling activation would be sufficient to rescue the Hedgehog phenotype, and vice versa. *TCF3-VP16GR* overexpression indeed prevented Hedgehog-dependent excess in gliogenesis (Fig. 1G). Conversely, the Wnt-induced increase in neuroepithelial cells was abolished upon *Ihh-CD2* co-lipofection (Fig. 1H). In addition, blocking Hedgehog signalling using the Smoothened antagonist cyclopamine also rescued the Müller phenotype of *dnTCF3-GR*-lipofected embryos (Fig. 1I). Together, these data show that Hedgehog and Wnt signalling pathways have opposite outcomes for retinal progenitor destiny, which is likely to reflect their inverse roles in cell cycle exit regulation. We further tested this hypothesis by directly evaluating the timing of cell cycle exit in each condition through birthdating experiments (Fig. 2). Embryos were subjected to constant EdU exposure from stage 32 to stage 41, so that all cells born in that period would be labelled. As expected, *Ihh-CD2* or *dnTCF3-GR* lipofection led to a decreased proportion of EdU-positive cells among transfected cells (including among Müller cells; supplementary material Fig. S4), showing a precocious cell cycle exit, whereas *TCF3-VP16GR* lipofection or cyclopamine treatment led to the opposite effect, indicative of a delayed cell birthdate. Finally, co-activation or co-inhibition of both pathways rescued the phenotypes back to a control situation. These data thus confirm that the Hedgehog and Wnt signalling pathways have opposite impacts on the timing of retinal cell cycle exit.

Wnt and Hedgehog pathways lead to opposite proliferative phenotypes in the post-embryonic retina

Could such a functional antagonism also hold true in the context of post-embryonic retinal neurogenesis? As a prerequisite to answering this question, we first set up experimental conditions that allow conditional Wnt and Hedgehog signalling activation or inhibition through pharmacological means. The compound 6-bromoindirubin-3′-oxime (BIO), a selective GSK-3 inhibitor (Meijer et al., 2003), and IWR-1, a small molecule that prevents Axin protein degradation (Chen et al., 2009), were previously described as an effective activator and inhibitor of the canonical Wnt pathway, respectively. We took advantage of a *X. tropicalis* Wnt reporter line (Tran et al., 2010) to control their effectiveness and determine optimal concentrations and exposure conditions. As previously described in *X. laevis* (Denayer et al., 2008), we detected Wnt activity within the CMZ (Fig. 3A). In addition, the destabilised character of the eGFP reporter allowed us to more sharply delineate the territory concerned, which appeared restricted to the peripheral half of the CMZ that includes the stem cell-containing zone. This territory was found to be significantly expanded 24 hours following BIO treatment and dramatically reduced upon IWR-1 exposure (Fig. 3B,C). We thus used these conditions for subsequent analyses. Activity of Hedgehog signalling was assessed through the expression of its target genes *Patched-1* (*Ptc1*) and *Gli1* and could be detected, as expected, within the CMZ (Perron et al., 2003), as well as in the periocular mesenchyme as previously described in mouse (Dakubo et al., 2008) (Fig. 3D,E). Functional interference with the pathway was achieved using the Smoothened agonist purmorphamine and the antagonist cyclopamine. We found that a 24-hour treatment with these drugs was sufficient for consistent activation or inhibition of the pathway, respectively, as revealed by the dramatic increase or reduction of both *Ptc1* and *Gli1* staining (Fig. 3D-G).

In order to address the respective and interactive contributions of the Wnt and Hedgehog pathways to post-embryonic proliferation, we next performed BrdU incorporation assays following their pharmacological perturbation for 24 hours (Fig. 4). In this time window, although the size of the whole CMZ (as measured by the extent of the *Rx1* labelling area; supplementary material Fig. S5A,B) was seemingly unaffected, significant variations in the number of BrdU-positive cells could be detected. We previously demonstrated that Wnt signalling is required for the maintenance of proliferation at post-embryonic stages (Denayer et al., 2008). Accordingly, BIO-treated tadpoles exhibited an increased number of BrdU-labelled cells in the CMZ compared with control retinas, whereas proliferation levels significantly dropped following IWR-1 treatment (Fig. 4B). Strikingly, exposure to purmorphamine reduced BrdU incorporation below the control level, as observed for IWR-1 treatment. Conversely, tadpole exposure to cyclopamine increased BrdU-positive cell number within the CMZ, thus phenocopying the BIO treatment (Fig. 4B). Moreover, similar changes in the number of PCNA-positive cells were observed for each condition (supplementary material Fig. S6), confirming variations in the size of the whole proliferative cell cohort. Based on our above lipofection data (Fig. 1), we reasoned that co-activating or co-inhibiting both pathways should restore a

DEVELOPMENT

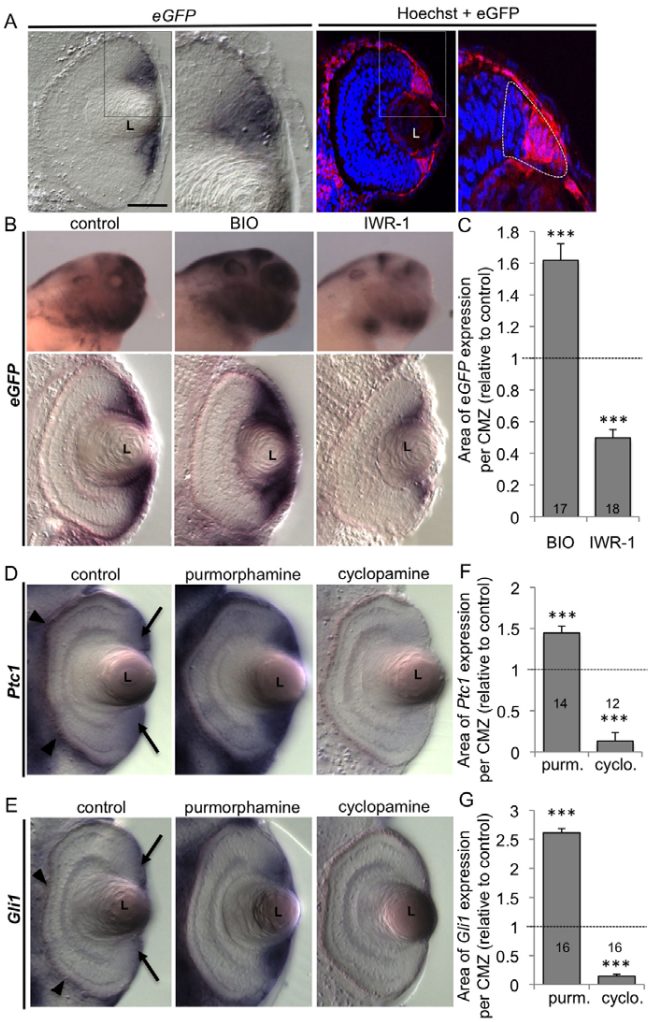


Fig. 3. BIO, IWR-1, purmorphamine and cyclopamine act as efficient Wnt and Hedgehog pathway activators or inhibitors in the *Xenopus* tadpole retina. (**A**) In situ hybridisation or immunofluorescence analyses of *eGFP* expression on stage 40 retinal sections from Wnt-responsive transgenic animals. Enlargements of the ciliary marginal zone (CMZ) region (delineated with dotted line) show that *GFP* expression is strongest in the peripheral half of the CMZ, including the stem cell zone. Note that Wnt activity is also detected in the peripheral retinal pigment epithelium (RPE). (**B**,**C**) In situ hybridisation against *eGFP* on stage 40 transgenic tadpoles 24 hours following BIO or IWR-1 treatment. (B) Representative images of staining in whole mount (lateral view of the head) and on retinal sections (dorsal side up). (C) Quantification of *eGFP* staining area per CMZ. (**D-G**) In situ hybridisation analyses of *Ptc1* (D) and *Gli1* (E) expression on stage 40 retinal sections 24 hours following purmorphamine or cyclopamine treatment. Note that *Ptc1* and *Gli1* are detected in the CMZ (arrows) and in the periocular mesenchyme (arrowheads). (F,G) Quantification of *Ptc1* and *Gli1* staining area per CMZ. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. ***P<0.001 (Student's *t*-test). Mean ± s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μm, except 400 μm in whole mounts.

wild-type phenotype. Indeed, CMZ proliferation levels following BIO/purmorphamine or IWR-1/cyclopamine co-treatments were not significantly different from the control situation (Fig. 4B). These data clearly demonstrate that altering the Wnt and Hedgehog signalling pathways during a period of 24 hours leads to opposite and counterbalancing proliferative outcomes in the post-embryonic CMZ.

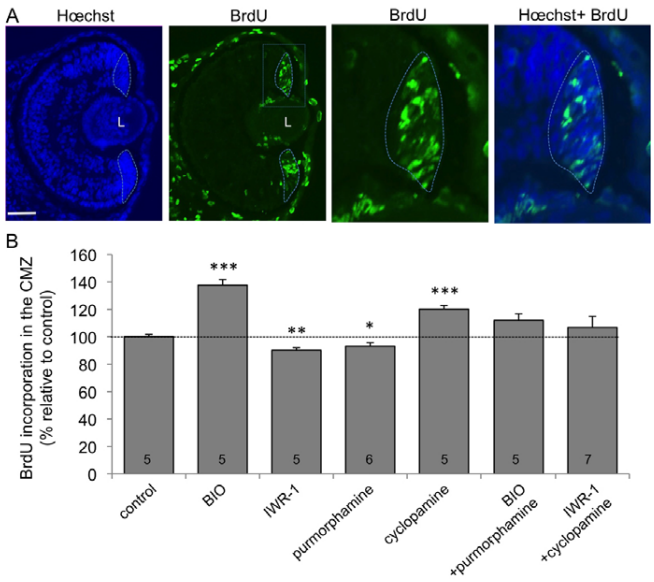


Fig. 4. Interfering with Hedgehog and Wnt pathways leads to opposite proliferative outcomes in the post-embryonic retina. BrdU incorporation assays (3-hour pulse) at stage 41, 24 hours following treatment with the indicated drugs. (**A**) Control retinal section illustrating how the CMZ, in which BrdU$^+$ cells are counted, is delineated (dotted lines) using Hoechst staining. Images on the right show higher magnifications of the CMZ. (**B**) Quantification of BrdU$^+$ cells in the CMZ. The total number of analysed retinas per condition is indicated in each bar. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 (Student's *t*-test). Mean ± s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μm.

Wnt and Hedgehog morphogens emanate from mutually exclusive territories of the post-embryonic retina

Such a negative Wnt/Hedgehog interplay is reminiscent of their well-established antagonistic functions in the patterning of the spinal cord, where they act as opposed morphogenetic signals along the dorsoventral axis (reviewed by Ulloa and Marti, 2010). We thus wondered whether such morphogen gradients could similarly take place in the CMZ, where both pathways are active (Fig. 3 and Fig. 5C). We determined the spatial distribution of Wnt and Hedgehog ligand transcripts in the mature retina by in situ hybridisation (Fig. 5 and see schematic in Fig. 10A). As previously shown (Perron et al., 2003), *Shh* is mainly expressed in the ganglion cell layer, whereas *Ihh* and *Dhh* are restricted to the central retinal pigment epithelium (RPE) and are excluded from its peripheral part surrounding the CMZ (Fig. 5A). Among Wnt ligands, neither *Wnt1*, *Wnt8*, *Wnt10b* nor *Wnt11r* could be detected in the mature retina (data not shown). Strikingly, however, *Wnt2b*, *Wnt3a*, *Wnt7b*, *Wnt8b*, *Wnt9a*, *Wnt9b* and *Wnt16* mRNAs were all localised within or around the CMZ. Labelling was found either in the peripheral RPE lining the CMZ, in the stem cell-containing zone of the CMZ, in the presumptive cornea or in epithelial cells of the lens (Fig. 5B; data not shown). Wnt and Hedgehog ligand genes thus exhibit mutually exclusive expression patterns along the central to peripheral axis of the post-embryonic retina, suggesting that opposing gradients might exist within the CMZ.

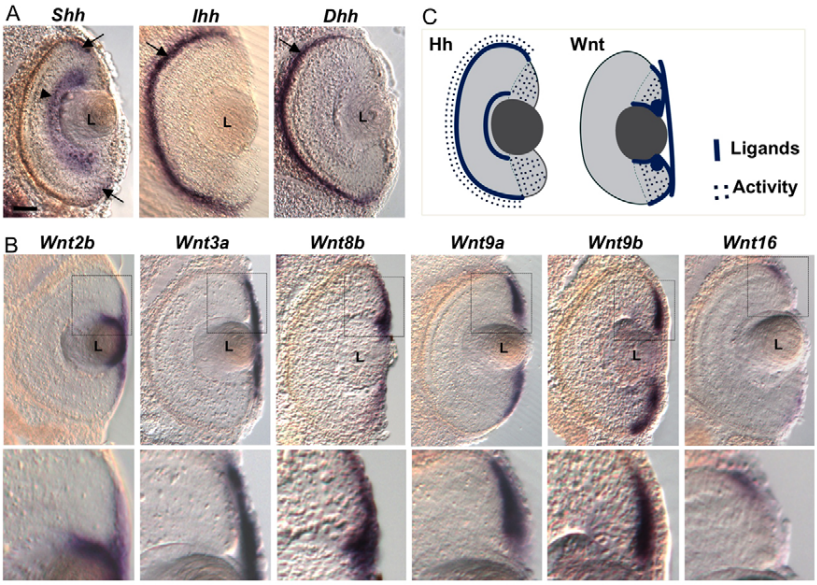


Fig. 5. Wnt and Hedgehog morphogens are expressed in mutually exclusive territories within the post-embryonic retina. (**A**,**B**) Retinal sections of stage 39/40 *Xenopus* tadpoles following in situ hybridisation with the indicated probes. (A) *Shh*, *Ihh* and *Dhh* are detected in the central RPE (arrows). Additionally, *Shh* labels the ganglion cell layer (arrowhead). (B) In contrast to Hedgehog genes, those encoding Wnt ligands are all expressed in the peripheral retina. Shown beneath each retinal section is a higher magnification of the CMZ region (boxed). *Wnt2b*, *Wnt8b*, *Wnt9a*, *Wnt9b* and *Wnt16* are detected in the peripheral RPE surrounding the CMZ (*Wnt8b* and *Wnt9a* exhibit a more intense staining dorsally than ventrally). *Wnt8b* is additionally expressed in the most peripheral stem cell-containing region of the CMZ, together with *Wnt2b*, which also labels the peripheral part of the lens. *Wnt3a* transcripts are present in the presumptive cornea and *Wnt7b* is expressed in the lens (not shown). (**C**) Summary of Hedgehog (Hh) and Wnt ligand expression in the retina, and of domains exhibiting Wnt (in the CMZ) and Hedgehog (in the CMZ and periocular mesenchyme) activity. L, lens. Scale bar: 40 μm.

The Wnt pathway restrains Hedgehog activity in the CMZ

We next investigated potential cross-regulation between the Wnt and Hedgehog cascades. Using pharmacological and genetic tools, we first analysed the impact of Wnt pathway activation on Hedgehog signalling activity by examining the effects of a 24-hour BIO treatment. Although treated retinas appeared slightly smaller than controls, no developmental delay or defects in the central retina were observed, as assessed by the normal expression pattern of various differentiated cell markers (supplementary material Fig. S7). Consistent with an effective activation of canonical Wnt signalling in the CMZ (Denayer et al., 2008), the expression of *CyclinD1*, an established Wnt transcriptional target gene, was dramatically enhanced compared with the control situation (Fig. 6A). Of note, the overall size of the CMZ as inferred from the *Rx* expression domain was not significantly affected (supplementary material Fig. S5C,D). By contrast, the expression of the Hedgehog transcriptional targets *Ptc1* and *Gli1* was virtually abolished, reflecting a significant inhibition of the pathway (Fig. 6A,B). Importantly, these results were validated by two additional strategies: *TCF3-VP16GR* overexpression by mRNA microinjection at the four-cell stage (Fig. 6C,D) and treatment with LiCl (supplementary material Fig. S8), which is the most frequently used GSK-3β inhibitor, although supposedly less specific than BIO (Meijer et al., 2003). These data suggest that activating the Wnt pathway attenuates Hedgehog signalling activity in the post-embryonic retina.

We next monitored Hedgehog activity following inhibition of Wnt signalling. Retinas of IWR-1-treated tadpoles displayed reduced *CyclinD1* staining with respect to controls. By contrast, *Gli1* and *Ptc1* expression was strongly enhanced within the CMZ (Fig. 6E,F), suggesting an increase in Hedgehog pathway activity.

To support these in situ hybridisation results, we quantified *Ptc1* expression by qPCR following genetic or pharmacological modulation of Wnt signalling. Consistent with the previous data, we found decreased *Ptc1* mRNA levels upon BIO treatment or *TCF3-VP16GR* injection and the opposite result in IWR-1-treated retinas (Fig. 6G). Finally, we confirmed these results in two *Xenopus* transgenic lines in which the Wnt pathway can be conditionally activated (LEF1-VP16 Tg) or repressed (LEF1-EnR Tg) (Fig. 6H). Together, these data suggest that the Wnt pathway is required to limit Hedgehog activity in the CMZ.

Hedgehog signalling negatively regulates Wnt activity in the CMZ

We then examined whether the Hedgehog pathway might reciprocally inhibit Wnt signalling activity. The Wnt-responsive transgenic tadpoles described above (Fig. 3) were treated for 24 hours with cyclopamine or purmorphamine and then subjected to immunofluorescence and in situ hybridisation to evaluate eGFP protein and mRNA expression levels, respectively. Hedgehog inhibition resulted in increased eGFP staining in the CMZ, whereas its activation led to the opposite phenotype (Fig. 7). Thus, Hedgehog signalling restricts Wnt activity, possibly contributing to its confinement to the peripheral part of the CMZ.

The Hedgehog pathway restricts Wnt activity in the CMZ through transcriptional regulation of *Sfrp-1*

We next investigated the molecular mechanism by which the Hedgehog and Wnt pathways establish these reciprocal cross-regulations. The gene encoding the secreted protein SFRP-1, which is an antagonist of Wnt signalling (Xu et al., 1998),

DEVELOPMENT

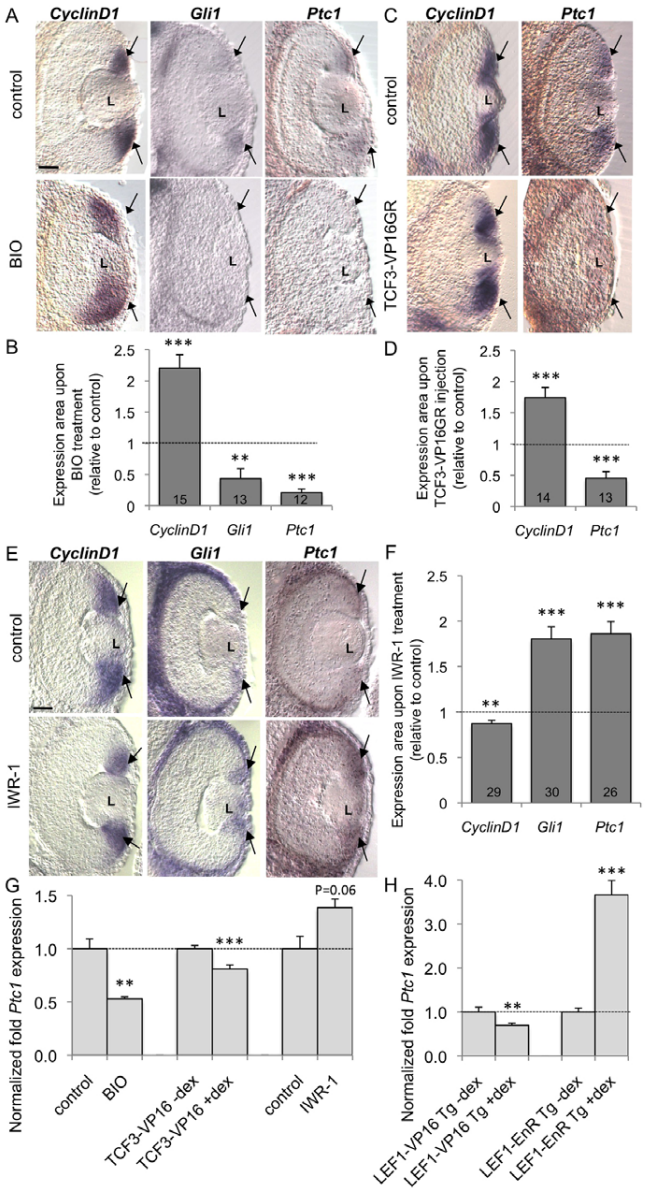


Fig. 6. Impact of Wnt pathway perturbations on Hedgehog signalling activity. (**A-F**) In situ hybridisation analyses of *CyclinD1*, *Gli1* or *Ptc1* expression on stage 38 retinal sections 24 hours following treatment with BIO (A,B), induction of TCF3-VP16GR activity in injected embryos (C,D), or treatment with IWR-1 (E,F). Arrows indicate CMZ labelling. (B,D,F) Quantifications of staining area for each transcript. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. (**G**,**H**) qPCR analysis of retinal *Ptc1* expression following Wnt signalling activation or inhibition as indicated. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ (Student's *t*-test). Mean ± s.e.m. L, lens. Scale bars: 40 μm.

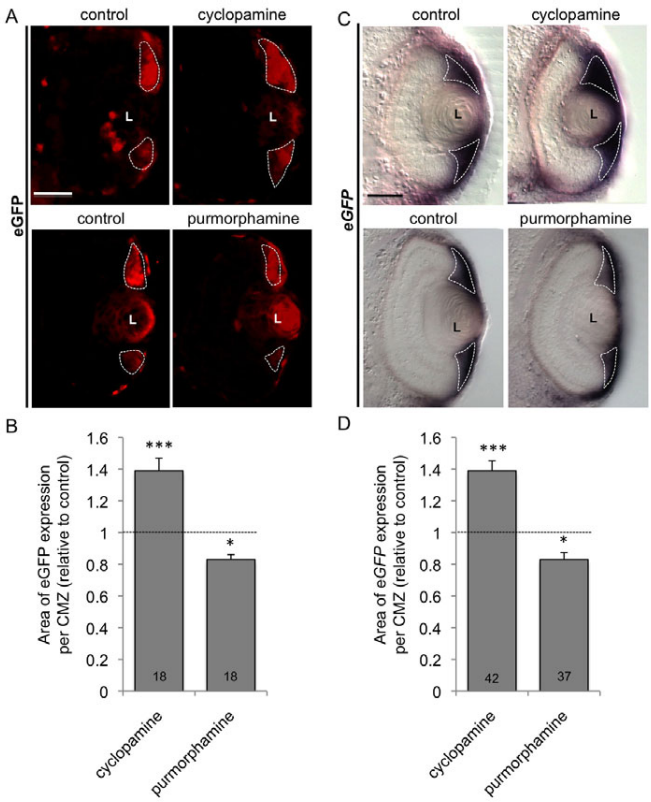


Fig. 7. Hedgehog signalling inhibits Wnt activity. (**A-D**) Immunofluorescence (A,B) or in situ hybridisation (C,D) analyses of *eGFP* expression in stage 40 retinas from Wnt-responsive transgenic animals following a 24-hour treatment with either cyclopamine or purmorphamine. (B,D) Quantification of *eGFP* staining area within the CMZ (delineated by dotted lines). Hoechst staining (for immunolabelling) and Nomarski (for in situ hybridisation) were used to delineate the CMZ in order to exclude RPE *eGFP* labelling from the quantification. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ (Student's *t*-test). Mean ± s.e.m. L, lens. Scale bars: 40 μm.

contains GLI binding sites in its promoter region (Katoh and Katoh, 2006) and has been shown to be regulated by Hedgehog in gastric cancer cells (He et al., 2006). In addition, *Sfrp-1* expression was shown to be enhanced by Hedgehog activation in the developing spinal cord (Domanitskaya et al., 2010). These features make *Sfrp-1* a prime candidate as a potential downstream target of the Hedgehog pathway in the post-embryonic retina. Consistent with this hypothesis, we found that *Sfrp-1* was highly expressed in the periocular mesenchyme, a tissue that lines Ihh- and Dhh-producing cells of the RPE (Fig. 8A) and exhibits Hedgehog signalling activity as inferred by *Ptc1* and *Gli1* expression (Fig. 3D,E and Fig. 5C). Cyclopamine exposure virtually abolished *Sfrp-1* staining, whereas purmorphamine treatment resulted in a marked enhancement of the signal in this region and revealed expression in cells adjacent to the CMZ (peripheral RPE, presumptive cornea and lens epithelium) (Fig. 8A). This upregulation could be observed by qPCR as little as 8 hours following purmorphamine application (Fig. 8B). These data strongly suggest that Hedgehog signalling regulates *Sfrp-1* expression in the mature retina.

As SFRP-1 is known to establish intricate and multiple interactions with the Wnt pathway (Bovolenta et al., 2008), we tested whether it could inhibit Wnt activity in the CMZ. We found that *eGFP* expression was significantly reduced in the retina of Wnt-responsive transgenic tadpoles exposed for 24 hours to SFRP-1 soluble protein (Fig. 8C,D), whereas it was increased upon morpholino-mediated *Sfrp-1* knockdown (Fig. 8E,F). These data are consistent with SFRP-1 acting as a Wnt signalling repressor in this CMZ context.

DEVELOPMENT

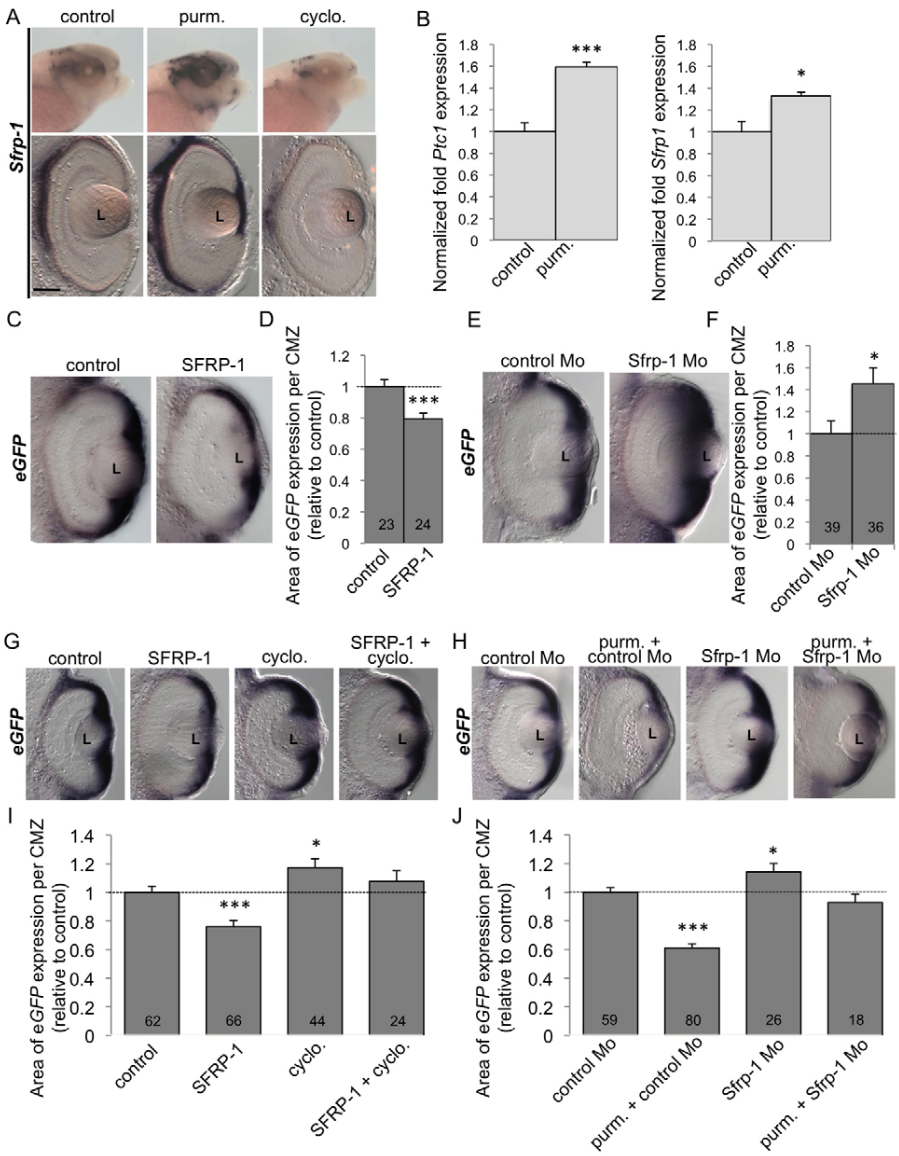


Fig. 8. The Hedgehog pathway negatively regulates Wnt activity through the transcriptional activation of *Sfrp-1*. (**A**) In situ hybridisation analysis of *Sfrp-1* expression on stage 41 retinal sections following a 24-hour treatment with purmorphamine (purm.) or cyclopamine (cyclo.). (**B**) qPCR analysis of *Ptc1* (as a control for purmorphamine activity) and *Sfrp-1* expression in the head of stage 38 sibling tadpoles following 8 hours of purmorphamine exposure. (**C-J**) In situ hybridisation analysis of *eGFP* expression in stage 40 retinas from Wnt-responsive transgenic animals exposed to SRFP-1 protein for 24 hours (C,D,G) or injected with *Sfrp-1* Mo (E,F,H). (G-J) Tadpoles were additionally treated for 24 hours with cyclopamine (G,I) or purmorphamine (H,J). (D,F,I,J) Quantification of *eGFP* staining area per CMZ in each condition. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ (Student's *t*-test). Mean ± s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μm.

Finally, to evaluate whether Hedgehog-dependent downregulation of Wnt activity could be mediated by *Sfrp-1*, we performed rescue experiments in Wnt-responsive transgenic embryos. *eGFP* expression was monitored either in *Sfrp-1* morphant tadpoles treated with purmorphamine or following concomitant exposure to SFRP-1 protein and cyclopamine (Fig. 8G-J). In both cases, eGFP expression was restored to a level similar to that observed in control embryos. We therefore propose that SFRP-1 serves as the molecular link that mediates the negative impact of the Hedgehog pathway on Wnt activity within the post-embryonic retina.

The Wnt/β-catenin pathway downregulates Hedgehog activity in the CMZ through *Gli3* transcriptional regulation

Gli3 is known as a transcriptional repressor of Hedgehog signalling in the absence of ligand stimulation (Jacob and Briscoe, 2003). As it is regulated by Wnt activity in the developing neural tube (Alvarez-Medina et al., 2008; Yu et al., 2008), we examined whether this might also be the case within the CMZ. Indeed, BIO- or LiCl-treated retinas exhibited a significant increase in *Gli3* expression, as assessed by in situ hybridisation or qPCR, whereas IWR-1 exposure led to the opposite phenotype (Fig. 9A-C, supplementary material Fig. S8). This suggests that Gli3 represents a key downstream effector of the Wnt pathway that might account for its negative impact on Hedgehog activity. Consistent with this hypothesis, we found that morpholino-mediated *Gli3* knockdown could rescue the decreased *Ptc1* expression observed in BIO-treated tadpoles (Fig. 9D). We therefore conclude that Wnt-dependent downregulation of Hedgehog activity is mediated by *Gli3* transcriptional regulation.

DISCUSSION

Our study provides new insights into the regulatory network underlying the finely tuned balance between proliferation and differentiation in a post-embryonic neurogenic niche. We discovered unexpected opposed and counterbalancing functions of Wnt and Hedgehog pathways in the tadpole retina that modulate neural stem/progenitor cell proliferation levels. This study also revealed that Hedgehog and Wnt morphogens are expressed in

DEVELOPMENT

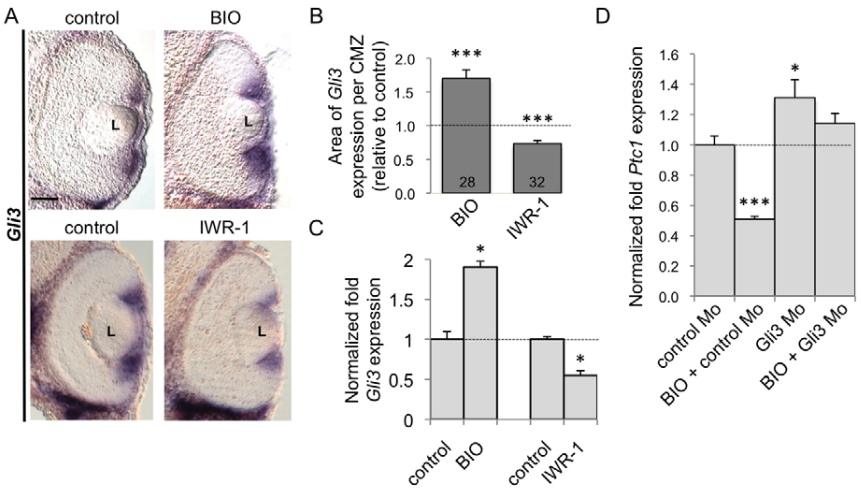


Fig. 9. The Wnt pathway negatively regulates Hedgehog activity through the transcriptional activation of *Gli3*. (**A**,**B**) In situ hybridisation analysis of *Gli3* expression (A) on stage 38 retinal sections 24 hours following BIO or IWR-1 treatment. (B) Quantification of *Gli3* staining area per CMZ. The total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. (**C**) qPCR analysis of retinal *Gli3* expression following 24-hour BIO or IWR-1 treatment. (**D**) qPCR analysis of retinal *Ptc1* expression following 24-hour BIO treatment on *Gli3* Mo-injected tadpoles. *$P<0.05$, ***$P<0.001$ (Student's *t*-test). Mean ± s.e.m. L, lens. Scale bar: 40 μm.

mutually exclusive retinal territories and reciprocally regulate each other's activity within the CMZ. Finally, we showed that this mutual inhibition is achieved by crosstalk involving the transcriptional regulation of *Sfrp-1* and *Gli3*. We propose that an intricate antagonistic interplay of Wnt and Hedgehog pathways tightly regulates the proliferation in the post-embryonic retina (Fig. 10).

A functional antagonism of Wnt and Hedgehog pathways has been described in several developmental processes in both vertebrate and invertebrate species in the context of tissue patterning and cell fate determination (Ahn et al., 2010; Danesin et al., 2009; Glise et al., 2002; Tang et al., 2010; Ulloa and Marti, 2010). Their relationship is however highly dependent on cell context. For instance, they either synergise or exert opposite effects in various aspects of endochondral skeletal development (Mak et al., 2006). Similarly, their interaction during neural development is far from straightforward. Hedgehog is indeed required upstream of the Wnt pathway to promote cell cycle progression in the neural tube (Alvarez-Medina et al., 2009), whereas it must be inhibited by Wnt signalling to allow midbrain progenitor proliferation (Joksimovic et al., 2009). Regarding adult neurogenesis, both pathways are thought to share a mitogenic influence on stem/progenitor cells (reviewed by Mu et al., 2010), suggesting a cooperative mode of action. Strikingly, however, we found in the present study that they instead trigger opposite and counterbalancing proliferative responses within the post-embryonic retina. Based on our lipofection experiments and previous data (Agathocleous et al., 2009; Denayer et al., 2008; Locker et al., 2006), we propose that the Wnt and Hedgehog pathways functionally counteract each other through opposed effects on cell cycle exit. Our study thus highlights for the first time an antagonistic interplay of the two pathways in the control of post-embryonic neural stem/progenitor cell proliferation. Interestingly, opposite influences of Wnt and Hedgehog have recently been described to control colonic epithelial cell renewal in the mammalian intestinal crypt (van den Brink et al., 2004; van Dop et al., 2009). This highlights a striking conservation of their interactions in ontologically unrelated adult stem cell niches.

The mutually exclusive expression patterns of Hedgehog and Wnt ligand genes in the mature retina are highly reminiscent of the situation along the dorsoventral axis of the spinal cord (Ulloa and Marti, 2010). It is thus tempting to imagine the existence of opposing gradients of Wnt and Hedgehog activities within the CMZ. Notably, Wnt signalling activity is not found throughout the whole CMZ but is restricted to its most peripheral half, at or in the immediate vicinity of Wnt ligand-producing cells. It is thus likely that Wnt proteins act locally to mainly influence retinal stem cell and early progenitor behaviour. By contrast, the more central location of Hedgehog ligand production sites suggests that they primarily impact on older progenitors, i.e. cells that are closer to cell cycle exit. Setting up a Hedgehog-responsive transgenic line would help in visualising the precise territory of Hedgehog activity within the CMZ and would be useful to validate this model. Besides, several studies have reported that the magnitude and the duration of Hedgehog signalling input can elicit different proliferative responses (Dessaud et al., 2010; Joksimovic et al., 2009; Ribes et al., 2010). Wnt/Hedgehog interaction modalities might thus vary along the timecourse of neurogenesis within the CMZ and thus differentially affect distinct cellular populations. Consequently, addressing these issues will be pivotal to further understand how these pathways dynamically coordinate post-embryonic neurogenesis in the retina.

We not only found antagonistic functions of the Wnt and Hedgehog pathways in terms of CMZ cell behaviour, but also revealed that they restrain each other's activity and we propose mechanisms underlying this crosstalk. Our results point to the *Sfrp-1* tumour suppressor gene as a key downstream target of the Hedgehog signalling that accounts for Wnt activity attenuation within the CMZ. This interaction is consistent with data from the intestinal crypt, where it was proposed, based on the expression patterns of *Ihh*, *Sfrp-1* and *Wnt6*, that Hedgehog-dependent *Sfrp-1* regulation could help to confine canonical Wnt signalling within stem and progenitor cells (Katoh and Katoh, 2006). For the first time, we formally demonstrate such a scenario in vivo by showing that (1) *Sfrp-1* expression indeed requires Hedgehog signalling, (2) SFRP-1 acts as a Wnt inhibitor in the CMZ and (3) it is necessary for Hedgehog-dependent downregulation of Wnt signalling. Conversely, how does the Wnt pathway counteract Hedgehog activity? As previously observed in the developing chick spinal cord (Alvarez-Medina et al., 2008; Yu et al., 2008), we propose that this occurs through the activation of *Gli3* transcription, as *Gli3* expression is required for the Wnt-dependent negative regulation of Hedgehog signalling. Whether *Sfrp-1* and *Gli3* regulation is sufficient to account for the observed Wnt/Hedgehog reciprocal inhibition remains to be investigated. Indeed, coordination between the two pathways might be more complicated, with additional

DEVELOPMENT

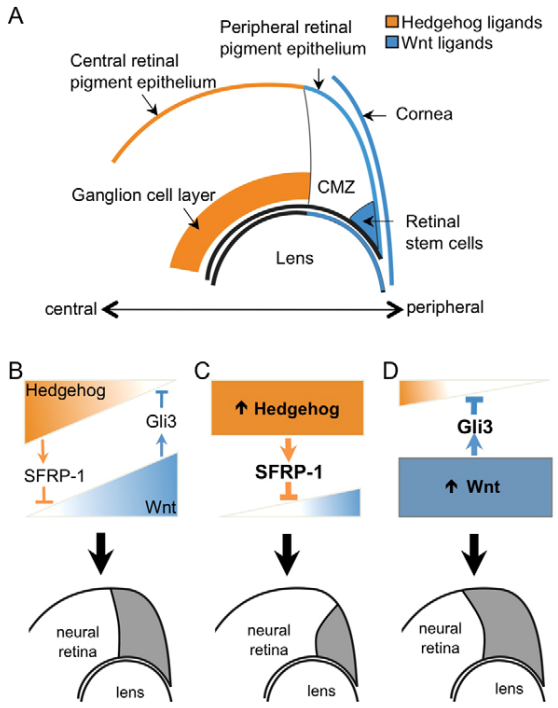


Fig. 10. Model of Wnt and Hedgehog interplay in the post-embryonic retina. (**A**) Schematic highlighting the mutually exclusive expression domains of Wnt and Hedgehog ligands along the central to peripheral axis of the post-embryonic retina. (**B-D**) Illustration of the activities of Wnt and Hedgehog pathways in the retinal neurogenic niche and of the proposed crosstalk underlying their mutual negative regulation. Shown are the hypothetical physiological situation (B), and the synopsis of our Hedgehog (C) or Wnt (D) activation experiments. Their opposed impacts on stem/progenitor cell proliferation are represented by changes in the CMZ proliferative cell population (grey) in the drawings beneath.

players at work, such as Sufu, which antagonises Hedgehog signalling in the retina (Cwinn et al., 2011) and has recently been shown to be involved in Hedgehog and Wnt crosstalk in the early *Xenopus* embryo (Min et al., 2011).

As a whole, our study highlights that stem/progenitor cell proliferation within the post-embryonic retina relies on a balance between opposed Wnt and Hedgehog influences (Fig. 10). This might be of direct relevance for setting up stem cell-based strategies to treat neurodegenerative eye diseases. Unlike in mammals, retinal regeneration in adult anuran amphibians occurs at least partly through CMZ stem cell recruitment (reviewed by Locker et al., 2010). It will thus be valuable to elucidate how the Wnt/Hedgehog balance behaves in the context of retinal injury and how it contributes to retinal repair.

Acknowledgements
We thank S. Sokol, S. Ekker, S. Ohnuma, A. Ruiz i Altaba, K. Takeshima, T. Pieler, P. A. Krieg, R. Moon, A. H. Monsoro-Burq, F. Cremisi and J. C. Saari for providing cDNAs or antibodies; P. Bovolenta for supplying SFRP-1 protein; B. Durand for *Gli3* morpholinos; M. Agathocleous for critical reading of the manuscript; M. Amato, V. Agrawal, J. Hamdache and A. Touzot for help with experiments; and C. de Meideros for animal care.

Funding
This research was supported by grants to M.P. from l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université Paris-Sud, Retina France, Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), Institut Fédératif de Recherche NeuroSud Paris (IFR144), and to K.V. from the Fonds Wetenschappelijk Onderzoek (FWO), the Belgian Federation against Cancer and the 'Geconcerteerde Onderzoeksacties of Ghent University'. C.B. is an ANR and Region Ile de France Fellow.

Competing interests statement
The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material
Supplementary material available online at
http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.079582/-/DC1

References

Adachi, K., Mirzadeh, Z., Sakaguchi, M., Yamashita, T., Nikolcheva, T., Gotoh, Y., Peltz, G., Gong, L., Kawase, T., Alvarez-Buylla, A. et al. (2007). Beta-catenin signalling promotes proliferation of progenitor cells in the adult mouse subventricular zone. *Stem Cells* **25**, 2827-2836.
Agathocleous, M., Locker, M., Harris, W. A. and Perron, M. (2007). A general role of hedgehog in the regulation of proliferation. *Cell Cycle* **6**, 156-159.
Agathocleous, M., Iordanova, I., Willardsen, M. I., Xue, X. Y., Vetter, M. L., Harris, W. A. and Moore, K. B. (2009). A directional Wnt/beta-catenin-Sox2-proneural pathway regulates the transition from proliferation to differentiation in the Xenopus retina. *Development* **136**, 3289-3299.
Ahn, S. and Joyner, A. L. (2005). In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* **437**, 894-897.
Ahn, Y., Sanderson, B. W., Klein, O. D. and Krumlauf, R. (2010). Inhibition of Wnt signalling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development* **137**, 3221-3231.
Alvarez-Medina, R., Cayuso, J., Okubo, T., Takada, S. and Marti, E. (2008). Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development* **135**, 237-247.
Alvarez-Medina, R., Le Dreau, G., Ros, M. and Marti, E. (2009). Hedgehog activation is required upstream of Wnt signalling to control neural progenitor proliferation. *Development* **136**, 3301-3309.
Balordi, F. and Fishell, G. (2007). Hedgehog signalling in the subventricular zone is required for both the maintenance of stem cells and the migration of newborn neurons. *J. Neurosci.* **27**, 5936-5947.
Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J. M., Cisneros, E. and Lopez-Rios, J. (2008). Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J. Cell Sci.* **121**, 737-746.
Centanin, L., Hoeckendorf, B. and Wittbrodt, J. (2011). Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell Stem Cell* **9**, 553-562.
Cerveny, K. L., Varga, M. and Wilson, S. W. (2011). Continued growth and circuit building in the anamniote visual system. *Dev. Neurobiol.* **72**, 328-345.
Chen, B., Dodge, M. E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C. W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N. S. et al. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signalling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 100-107.
Cwinn, M. A., Mazerolle, C., McNeill, B., Ringuette, R., Thurig, S., Hui, C. C. and Wallace, V. A. (2011). Suppressor of fused is required to maintain the multipotency of neural progenitor cells in the retina. *J. Neurosci.* **31**, 5169-5180.
Dakubo, G. D., Mazerolle, C., Furimsky, M., Yu, C., St-Jacques, B., McMahon, A. P. and Wallace, V. A. (2008). Indian hedgehog signaling from endothelial cells is required for sclera and retinal pigment epithelium development in the mouse eye. *Dev. Biol.* **320**, 242-255.
Danesin, C., Peres, J. N., Johansson, M., Snowden, V., Cording, A., Papalopulu, N. and Houart, C. (2009). Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signalling center activities by Foxg1. *Dev. Cell* **16**, 576-587.
Daniels, M., Dhokia, V., Richard-Parpaillon, L. and Ohnuma, S. (2004). Identification of Xenopus cyclin-dependent kinase inhibitors, p16Xic2 and p17Xic3. *Gene* **342**, 41-47.
de Croze, N., Maczkowiak, F. and Monsoro-Burq, A. H. (2011). Reiterative AP2a activity controls sequential steps in the neural crest gene regulatory network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 155-160.
Decembrini, S., Andreazzoli, M., Vignali, R., Barsacchi, G. and Cremisi, F. (2006). Timing the generation of distinct retinal cells by homeobox proteins. *PLoS Biol.* **4**, e272.
Denayer, T., Locker, M., Borday, C., Deroo, T., Janssens, S., Hecht, A., van Roy, F., Perron, M. and Vleminckx, K. (2008). Canonical Wnt signalling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic Xenopus eyes. *Stem Cells* **26**, 2063-2074.
Dessaud, E., Ribes, V., Balaskas, N., Yang, L. L., Pierani, A., Kicheva, A., Novitch, B. G., Briscoe, J. and Sasai, N. (2010). Dynamic assignment and maintenance of positional identity in the ventral neural tube by the morphogen sonic hedgehog. *PLoS Biol.* **8**, e1000382.
Domanitskaya, E., Wacker, A., Mauti, O., Baeriswyl, T., Esteve, P., Bovolenta, P. and Stoeckli, E. T. (2010). Sonic hedgehog guides post-crossing commissural

axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity. *J. Neurosci.* **30**, 11167-11176.
Ekker, S. C., McGrew, L. L., Lai, C. J., Lee, J. J., von Kessler, D. P., Moon, R. T. and Beachy, P. A. (1995). Distinct expression and shared activities of members of the hedgehog gene family of Xenopus laevis. *Development* **121**, 2337-2347.
Esteve, P., Trousse, F., Rodriguez, J. and Bovolenta, P. (2003). SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism. *J. Cell Sci.* **116**, 2471-2481.
Glise, B., Jones, D. L. and Ingham, P. W. (2002). Notch and Wingless modulate the response of cells to Hedgehog signalling in the Drosophila wing. *Dev. Biol.* **248**, 93-106.
Han, Y. G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J. M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S. and Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signalling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat. Neurosci.* **11**, 277-284.
He, J., Sheng, T., Stelter, A. A., Li, C., Zhang, X., Sinha, M., Luxon, B. A. and Xie, J. (2006). Suppressing Wnt signalling by the hedgehog pathway through sFRP-1. *J. Biol. Chem.* **281**, 35598-35602.
Jacob, J. and Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Rep.* **4**, 761-765.
Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Anderegg, A. M., Chang, W. W., Taketo, M. M., McKay, R. D. and Awatramani, R. B. (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **12**, 125-131.
Katoh, Y. and Katoh, M. (2006). WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signalling target. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 171-175.
Koebernick, K., Hollemann, T. and Pieler, T. (2003). A restrictive role for Hedgehog signalling during otic specification in Xenopus. *Dev. Biol.* **260**, 325-338.
Kuwabara, T., Hsieh, J., Muotri, A., Yeo, G., Warashina, M., Lie, D. C., Moore, L., Nakashima, K., Asashima, M. and Gage, F. H. (2009). Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat. Neurosci.* **12**, 1097-1105.
Lai, K., Kaspar, B. K., Gage, F. H. and Schaffer, D. V. (2003). Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat. Neurosci.* **6**, 21-27.
Lie, D. C., Colamarino, S. A., Song, H. J., Desire, L., Mira, H., Consiglio, A., Lein, E. S., Jessberger, S., Lansford, H., Dearie, A. R. et al. (2005). Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* **437**, 1370-1375.
Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M. A., Parain, K., Harris, W. A. and Perron, M. (2006). Hedgehog signalling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes Dev.* **20**, 3036-3048.
Locker, M., El Yakoubi, W., Mazurier, N., Dullin, J. P. and Perron, M. (2010). A decade of mammalian retinal stem cell research. *Arch. Ital. Biol.* **148**, 59-72.
Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritli-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L. et al. (2003). Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron* **39**, 937-950.
Mak, K. K., Chen, M. H., Day, T. F., Chuang, P. T. and Yang, Y. (2006). Wnt/beta-catenin signalling interacts differentially with Ihh signalling in controlling endochondral bone and synovial joint formation. *Development* **133**, 3695-3707.
Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R. et al. (2003). GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* **10**, 1255-1266.
Min, T. H., Kriebel, M., Hou, S. and Pera, E. M. (2011). The dual regulator Sufu integrates Hedgehog and Wnt signals in the early Xenopus embryo. *Dev. Biol.* **358**, 262-276.
Mu, Y., Lee, S. W. and Gage, F. H. (2010). Signalling in adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.* **20**, 416-423.
Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1994). *Normal Table of* Xenopus laevis. New York: Garland.
Ohnuma, S., Philpott, A., Wang, K., Holt, C. E. and Harris, W. A. (1999). p27Xic1, a Cdk inhibitor, promotes the determination of glial cells in Xenopus retina. *Cell* **99**, 499-510.
Ohnuma, S., Mann, F., Boy, S., Perron, M. and Harris, W. A. (2002). Lipofection strategy for the study of Xenopus retinal development. *Methods* **28**, 411-419.
Palma, V., Lim, D. A., Dahmane, N., Sanchez, P., Brionne, T. C., Herzberg, C. D., Gitton, Y., Carleton, A., Alvarez-Buylla, A. and Ruiz i Altaba, A. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* **132**, 335-344.
Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M. L. and Harris, W. A. (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the Xenopus eye. *Dev. Biol.* **199**, 185-200.
Perron, M., Boy, S., Amato, M. A., Viczian, A., Koebernick, K., Pieler, T. and Harris, W. A. (2003). A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development* **130**, 1565-1577.
Po, A., Ferretti, E., Miele, E., De Smaele, E., Paganelli, A., Canettieri, G., Coni, S., Di Marcotullio, L., Biffoni, M., Massimi, L. et al. (2010). Hedgehog controls neural stem cells through p53-independent regulation of Nanog. *EMBO J.* **29**, 2646-2658.
Ribes, V., Balaskas, N., Sasai, N., Cruz, C., Dessaud, E., Cayuso, J., Tozer, S., Yang, L. L., Novitch, B., Marti, E. et al. (2010). Distinct Sonic Hedgehog signalling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev.* **24**, 1186-1200.
Sekkali, B., Tran, H. T., Crabbe, E., De Beule, C., Van Roy, F. and Vleminckx, K. (2008). Chicken beta-globin insulator overcomes variegation of transgenes in Xenopus embryos. *FASEB J.* **22**, 2534-2540.
Tang, M., Villaescusa, J. C., Luo, S. X., Guitarte, C., Lei, S., Miyamoto, Y., Taketo, M. M., Arenas, E. and Huang, E. J. (2010). Interactions of Wnt/beta-catenin signalling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.* **30**, 9280-9291.
Tran, H. T., Sekkali, B., Van Imschoot, G., Janssens, S. and Vleminckx, K. (2010). Wnt/beta-catenin signalling is involved in the induction and maintenance of primitive hematopoiesis in the vertebrate embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 16160-16165.
Ulloa, F. and Marti, E. (2010). Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Dev. Dyn.* **239**, 69-76.
van den Brink, G. R., Bleuming, S. A., Hardwick, J. C., Schepman, B. L., Offerhaus, G. J., Keller, J. J., Nielsen, C., Gaffield, W., van Deventer, S. J., Roberts, D. J. et al. (2004). Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signalling in colonic epithelial cell differentiation. *Nat. Genet.* **36**, 277-282.
van Dop, W. A., Uhmann, A., Wijgerde, M., Sleddens-Linkels, E., Heijmans, J., Offerhaus, G. J., van den Bergh Weerman, M. A., Boeckxstaens, G. E., Hommes, D. W., Hardwick, J. C. et al. (2009). Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the hedgehog pathway. *Gastroenterology* **136**, 2195-2203 e1-7.
Van Raay, T. J., Moore, K. B., Iordanova, I., Steele, M., Jamrich, M., Harris, W. A. and Vetter, M. L. (2005). Frizzled 5 signalling governs the neural potential of progenitors in the developing Xenopus retina. *Neuron* **46**, 23-36.
Wetts, R., Serbedzija, G. N. and Fraser, S. E. (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Dev. Biol.* **136**, 254-263.
Xu, Q., D'Amore, P. A. and Sokol, S. Y. (1998). Functional and biochemical interactions of Wnts with FrzA, a secreted Wnt antagonist. *Development* **125**, 4767-4776.
Yu, W., McDonnell, K., Taketo, M. M. and Bai, C. B. (2008). Wnt signalling determines ventral spinal cord cell fates in a time-dependent manner. *Development* **135**, 3687-3696.

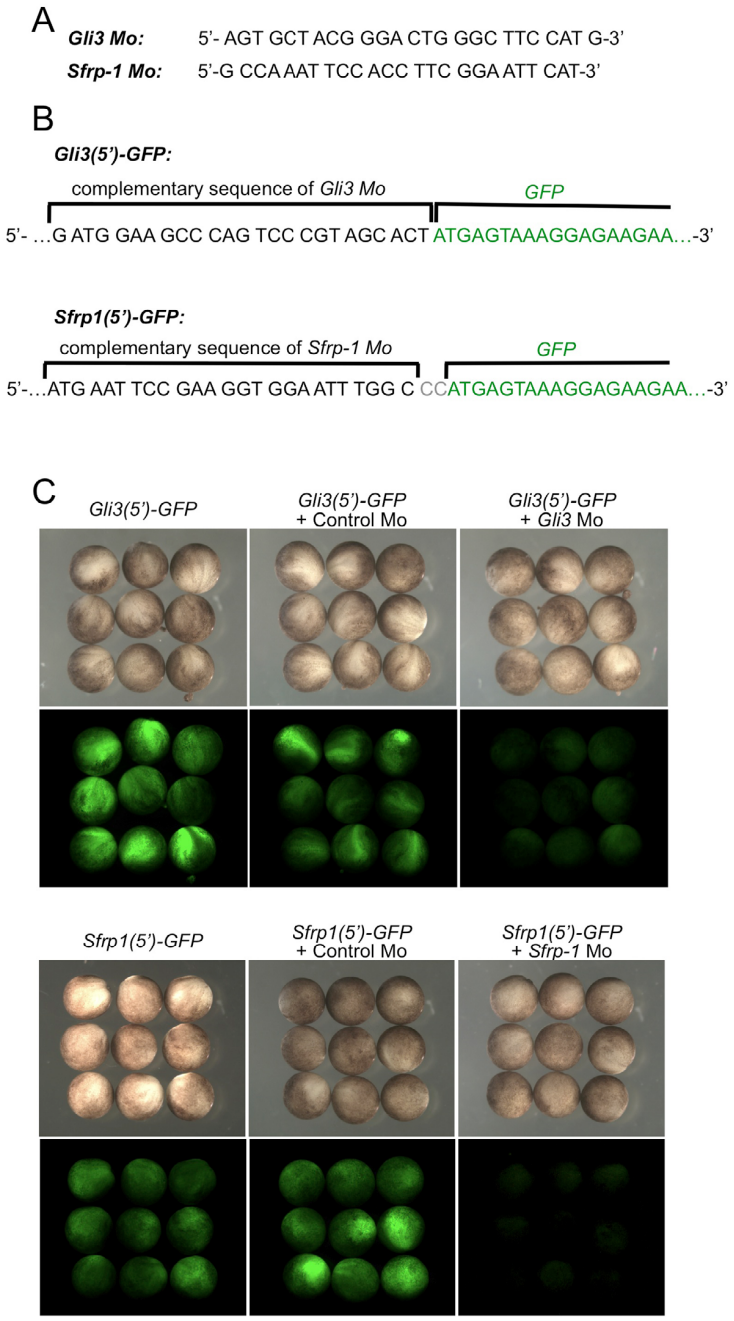


Fig. S1. In vivo validation of *Gli3* and *Sfrp-1* morpholino efficiency. (**A**) *Gli3* and *Sfrp-1* morpholinos (Mo) have been designed to target the ATG region of the corresponding transcripts. (**B**) Schematic representation of the chimeric constructs containing *GFP* fused downstream of *Gli3* or *Sfrp-1* Mo-complementary sequence [*Gli3(5')-GFP* or *Sfrp-1(5')-GFP*]. (**C**) In vivo GFP fluorescence was analysed at stage 19 following co-injection of the indicated Mo and GFP mRNA constructs. *Gli3* and *Sfrp-1* Mo inhibited GFP translation from *Gli3(5')-GFP* and *Sfrp-1(5')-GFP* constructs, respectively, whereas control Mo did not.

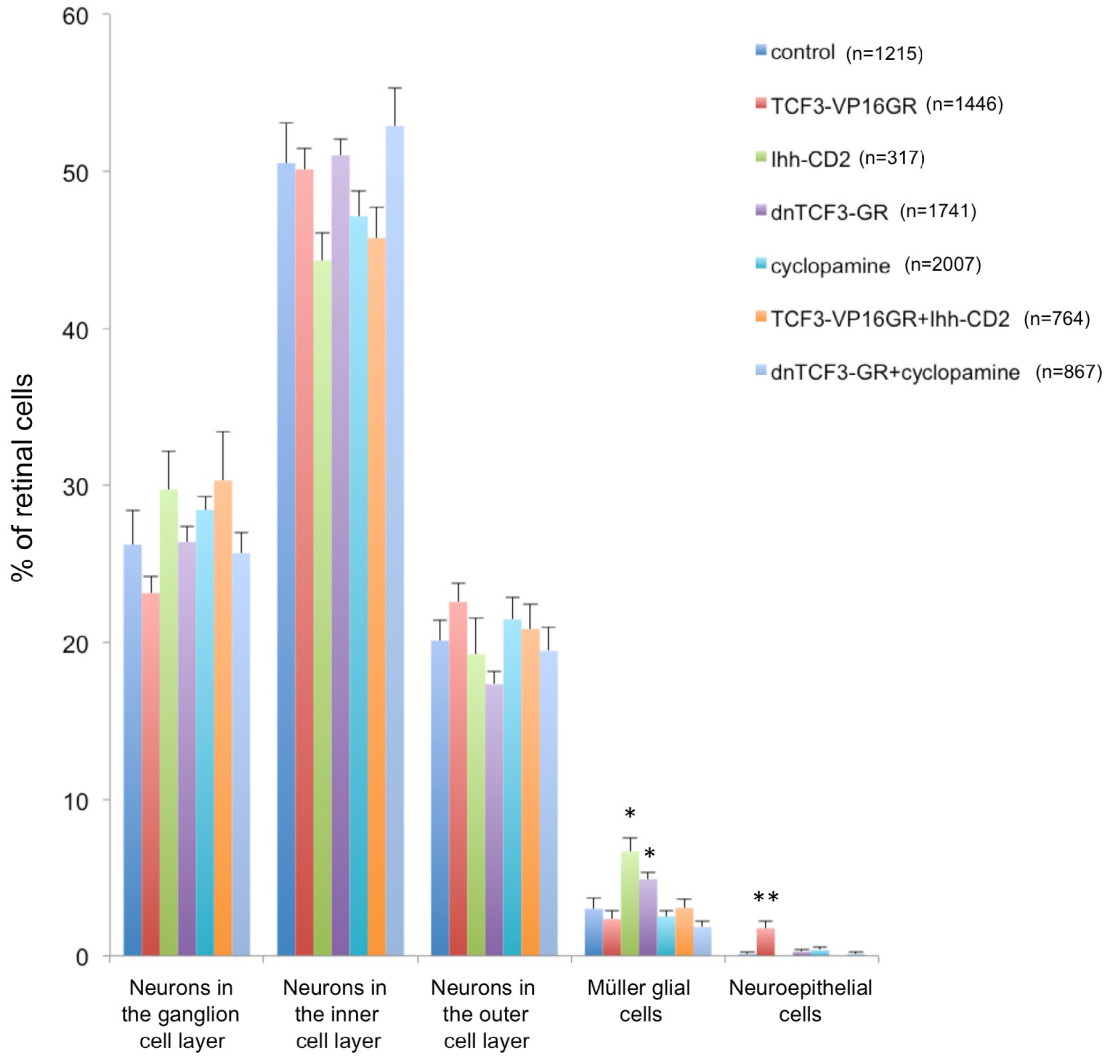


Fig. S2. Clonal analysis of cell type distribution in the retina following interference with Wnt and Hedgehog signalling pathways. Percentage of retinal cells observed in stage 41 retinas following in vivo lipofection with the indicated constructs. Cyclopamine treatment was performed from stage 18 onwards on embryos lipofected with *GFP*. Hedgehog or Wnt signalling perturbation significantly affects the percentage of Müller or neuroepithelial cells (see also Fig. 1). However, as these cells represent very minor cell subpopulations, their variations do not significantly impact on the percentage of neurons (which represent around 95% of total cells). Total number of counted cells is indicated for each condition. *$P<0.05$, **$P<0.01$ (Student's *t*-test).

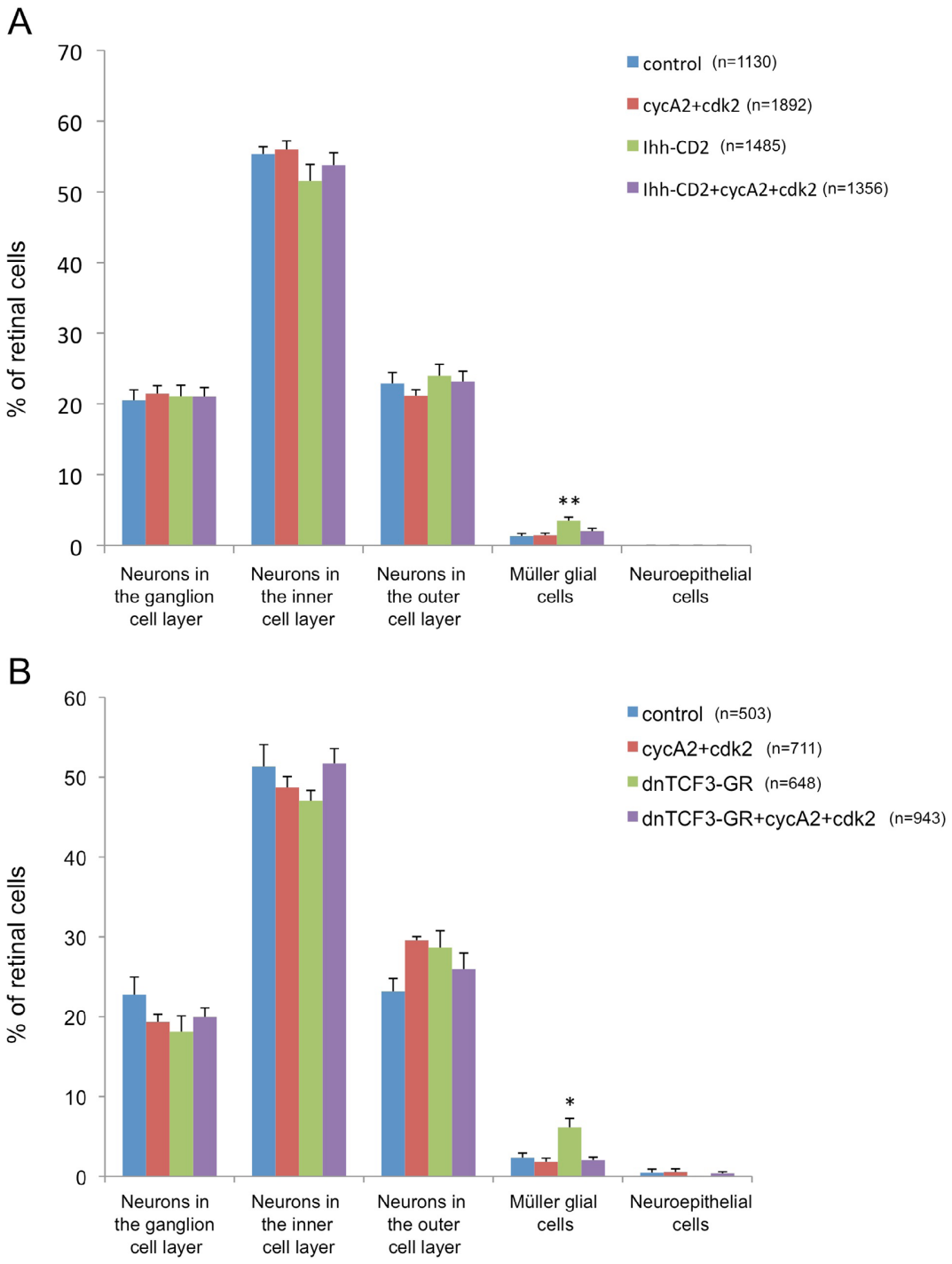


Fig. S3. Co-lipofection of *cyclinA2/cdk2* with either *Ihh-CD2* or *dnTCF3-GR* leads to a cell distribution indistinguishable from that observed in a control situation. (**A**,**B**) Percentage of retinal cells observed in stage 41 retinas following in vivo lipofection with the indicated constructs. Total number of counted cells is indicated for each condition. *$P<0.05$, **$P<0.01$ (Student's *t*-test).

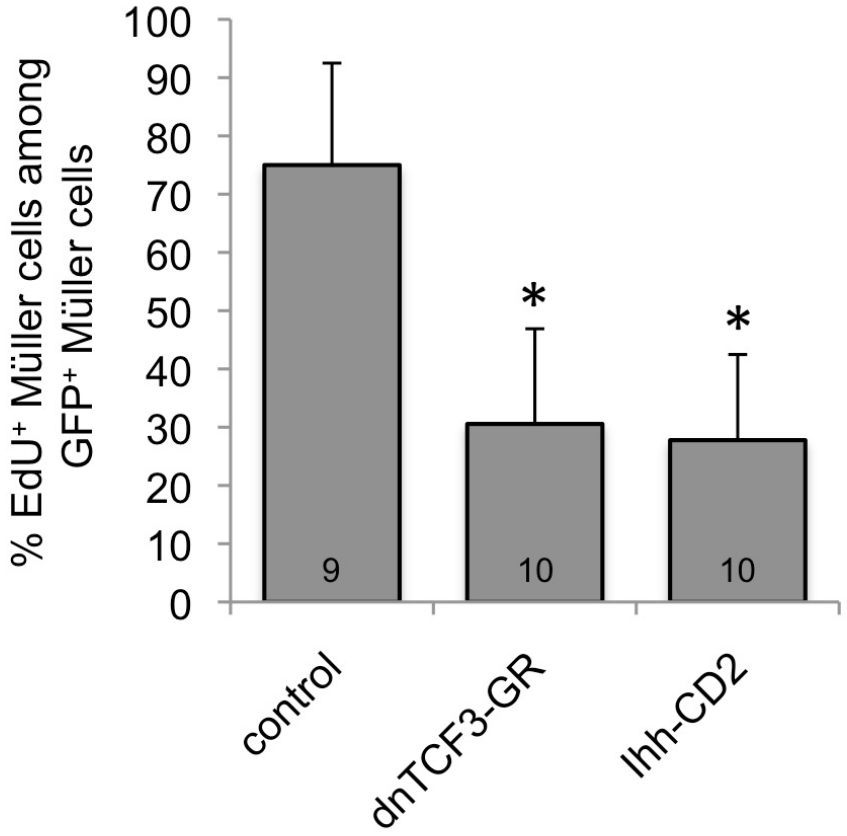


Fig. S4. Hedgehog and Wnt pathways have opposite impacts on cell cycle exit of Müller cells. Birthdating experiments (from stage 32 to stage 41) following in vivo lipofection with the indicated constructs. Transfected Müller cells that have exited the cell cycle before EdU exposure (stage 32) are EdU^- at stage 41, whereas Müller cells that have exited the cell cycle at any time during the EdU incorporation period are EdU^+. Graph represents the percentage of EdU^+ Müller cells among transfected Müller cells. Total number of analysed Müller cells per condition is indicated in each bar. $^*P<0.05$ (Student's *t*-test).

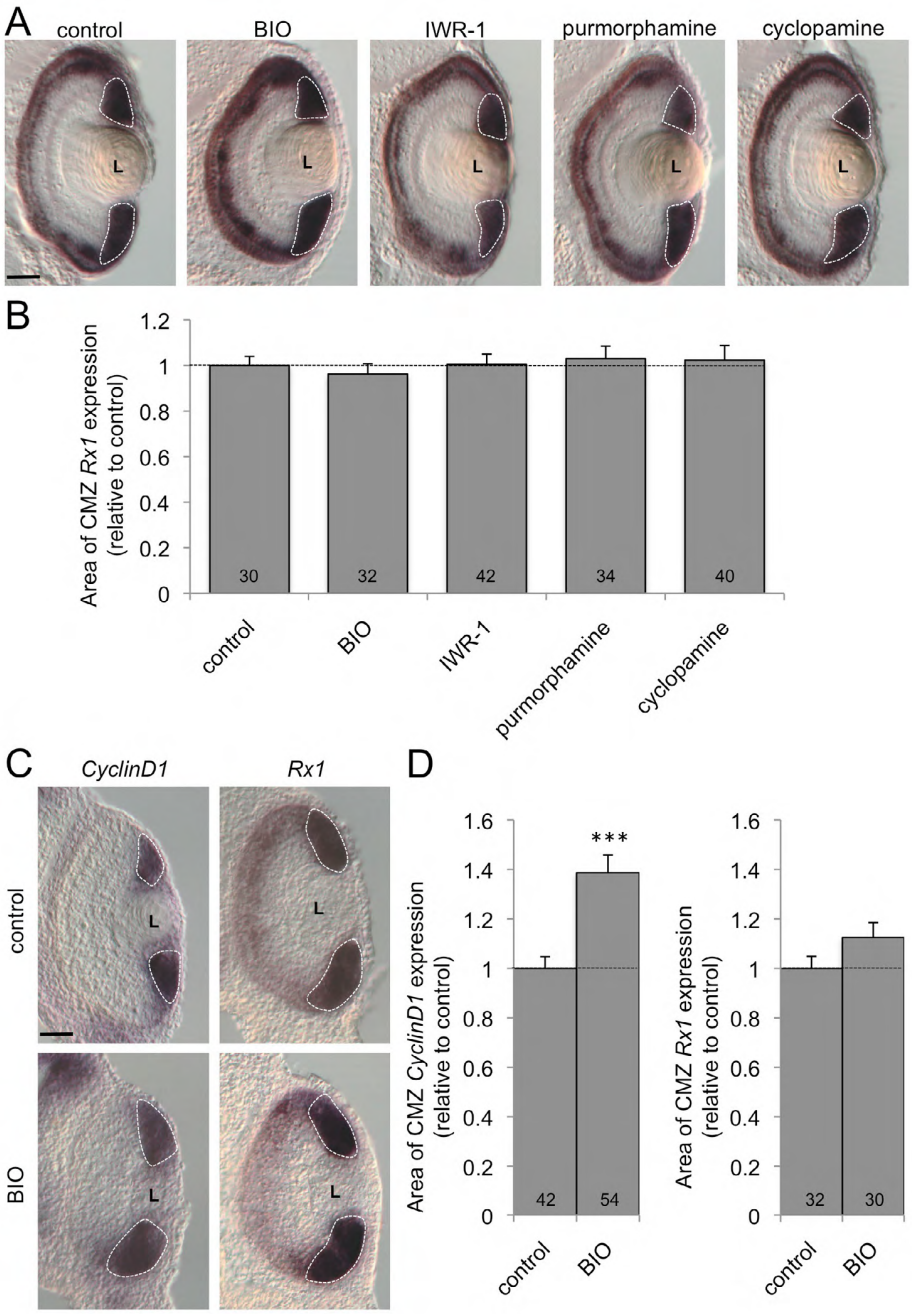


Fig. S5. The overall size of the CMZ is not affected upon pharmacological perturbation of the Wnt or Hedgehog signalling pathway. (**A**,**B**) In situ hybridisation analyses (A) of *Rx1* expression on stage 41 retinal sections 24 hours following BIO, IWR-1, purmorphamine or cyclopamine treatment as indicated. (B) Quantification of *Rx1* staining area per CMZ in each condition. (**C**,**D**) In situ hybridisation analyses (C) of *CyclinD1* or *Rx1* expression on stage 38 retinal sections 24 hours following treatment with BIO. (D) Quantifications of staining area for each transcript. Total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. ***$P<0.001$ (Student's *t*-test). Labelling in the CMZ is delineated with dotted lines. L, lens. Scale bar: 40 µm.

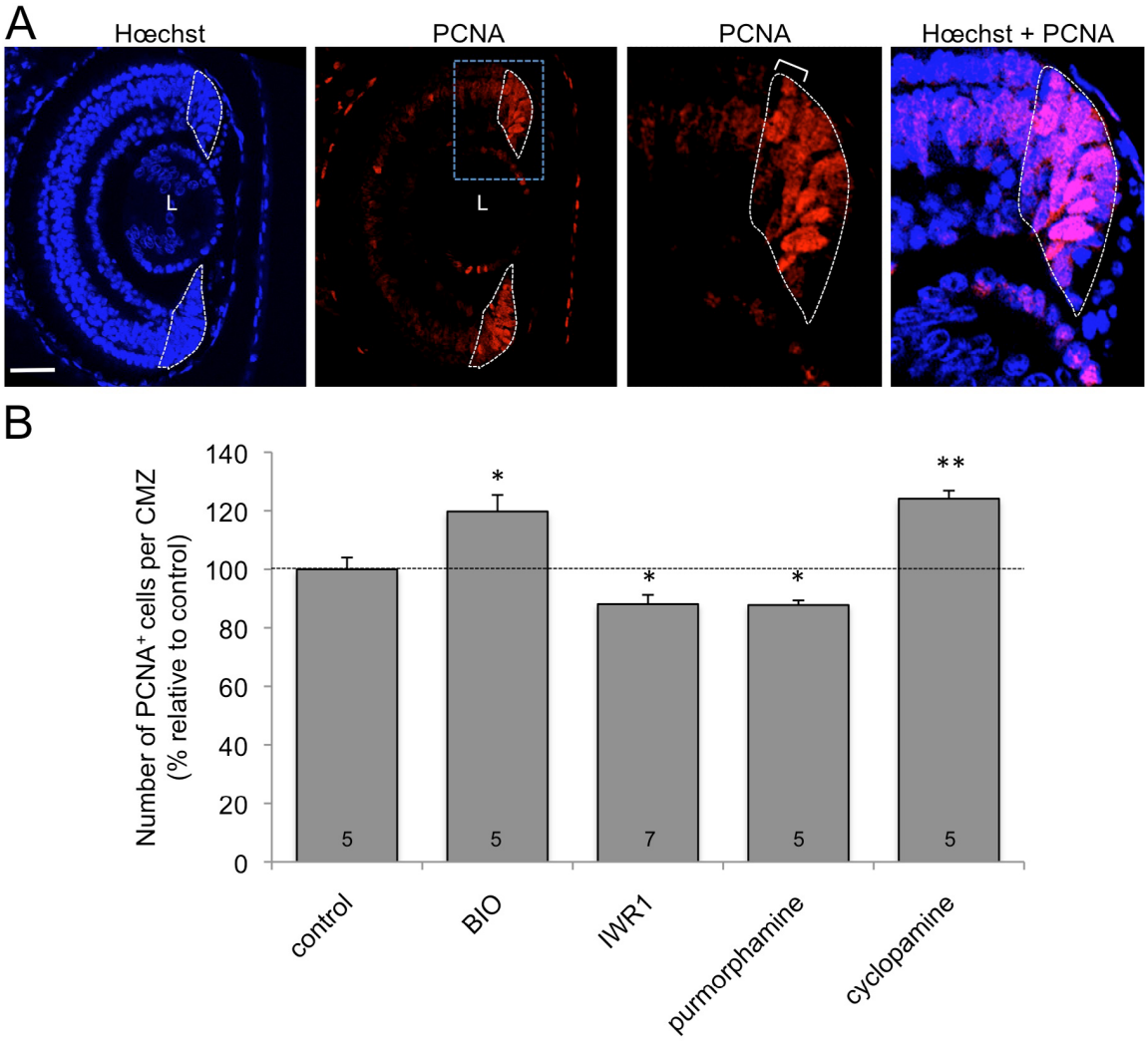


Fig. S6. PCNA immunostaining in the post-embryonic retina following pharmacological perturbation of the Wnt or Hedgehog signalling pathway. PCNA labelling analysis on stage 41 retinal sections 24 hours following treatment with the indicated drugs. (**A**) Typical control retinal section immunostained with anti-PCNA. Pictures on the right show high magnifications of the CMZ (delineated with dotted lines). Note that PCNA labels the whole CMZ, i.e. proliferative cells as expected, but also newly born postmitotic cells in the most central part of the CMZ (bracket). This is likely to be due to the long half-life of the antigen. (**B**) Quantification of PCNA$^+$ cells in the CMZ. Total number of analysed retinas per condition is indicated in each bar. *P<0.05, **P<0.01 (Student's t-test). L, lens. Scale bar: 40 µm.

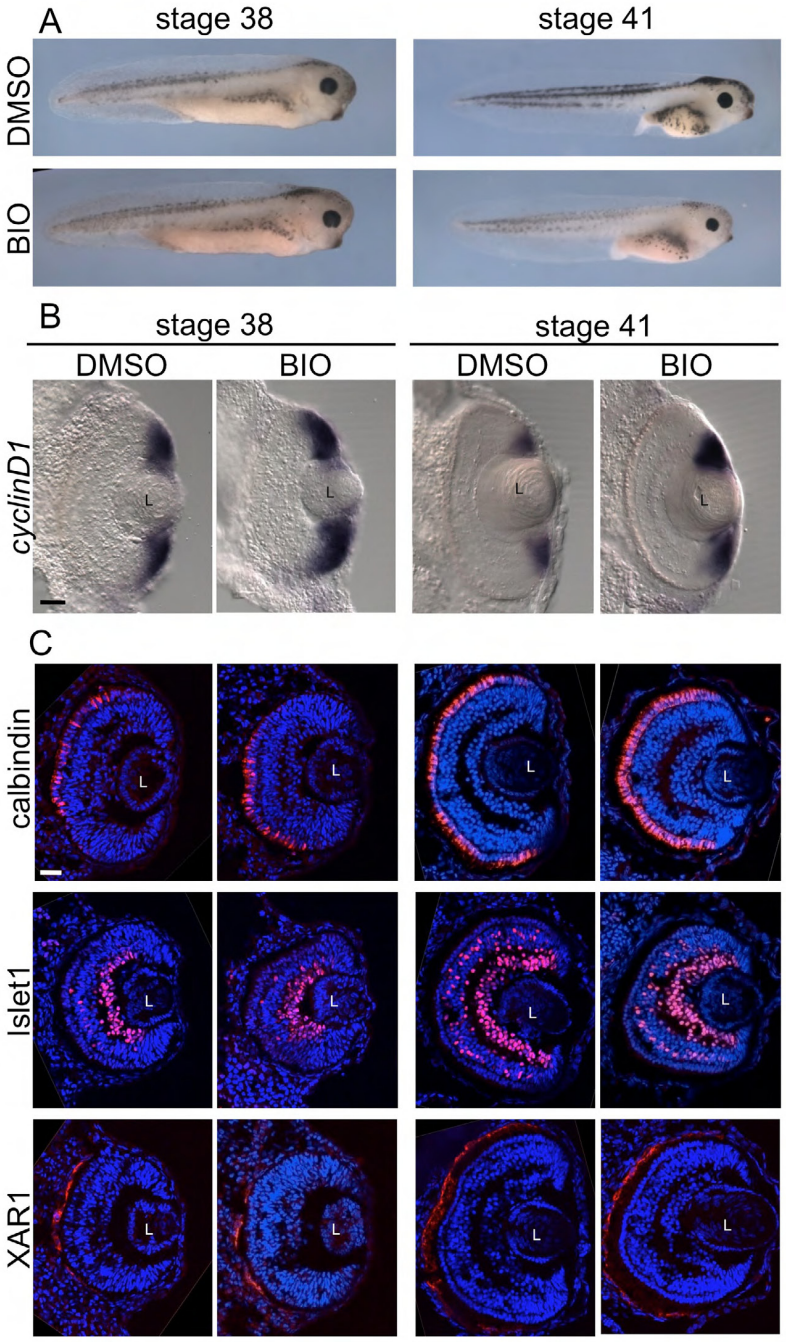


Fig. S7. Twenty-four hours of Wnt pathway activation does not delay development nor does it affect the central retina. (**A**) Tadpoles treated with BIO for 24 hours do not display any developmental delay, as judged by their overall morphology. (**B**) In situ hybridisation analysis of *CyclinD1* expression on retinal sections following a 24-hour BIO treatment, illustrating the effective activation of the Wnt pathway. (**C**) Immunofluorescence analysis of cell type-specific markers on sibling tadpoles. Calbindin is a marker of photoreceptor cells, Islet1 labels ganglion cells and a subtype of bipolar cells and XAR1 stains the RPE. L, lens. Scale bar: **40** µm.

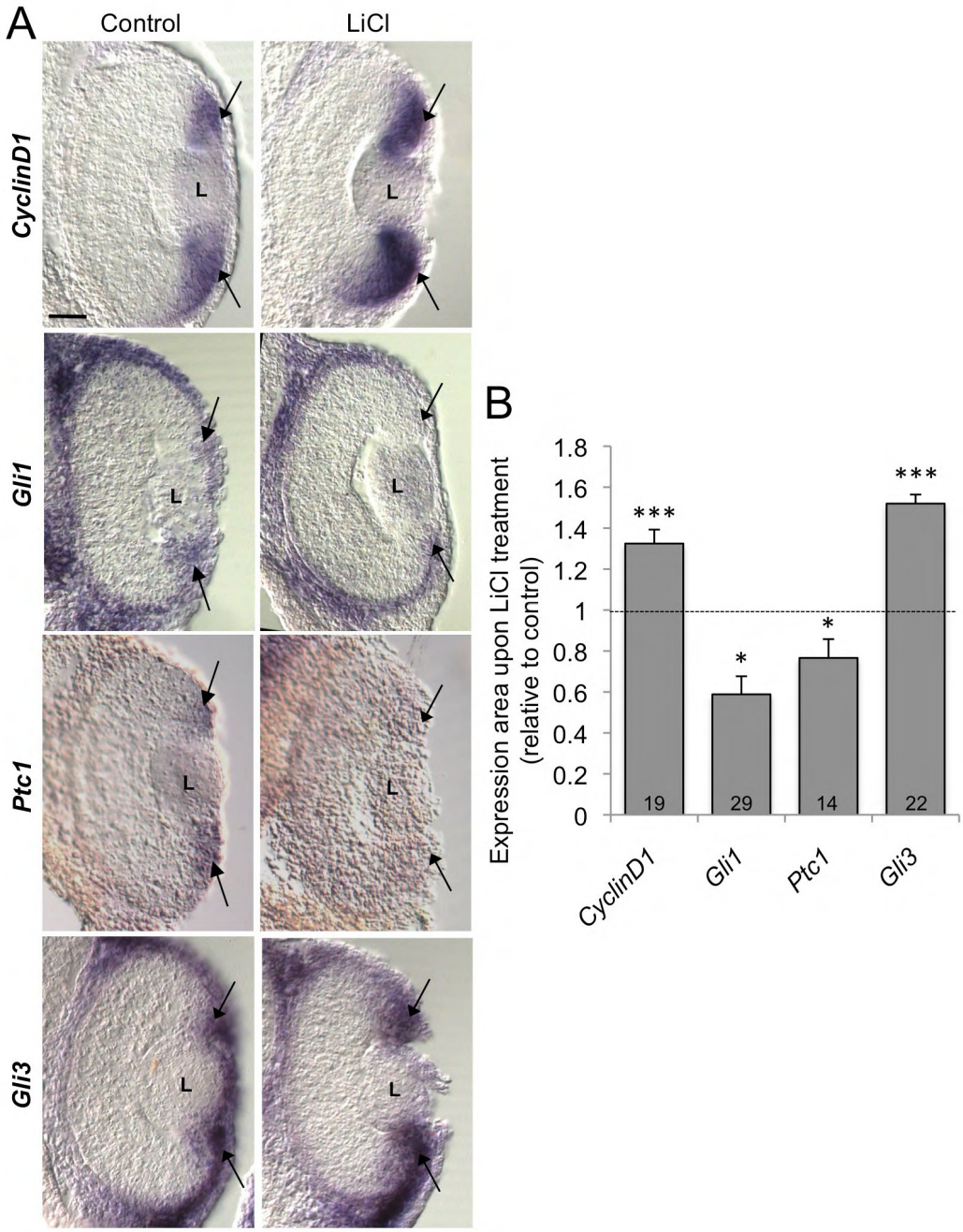


Fig. S8. Wnt pathway activation downregulates the Hedgehog target genes *Gli1* and *Ptc1* but increases *Gli3* expression. (**A**,**B**) In situ hybridisation analyses (A) of *CyclinD1*, *Gli1*, *Ptc1* or *Gli3* expression on stage 38 retinal sections 24 hours following LiCl treatment. Arrows indicate CMZ labelling. (B) Quantification of staining area for each gene. Compared with controls, LiCl-treated embryos exhibit decreased *Gli1* and *Ptc1* staining, whereas *Gli3* expression is enhanced. Total number of analysed sections per condition is indicated in each bar. $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$ (Student's *t*-test). L, lens. Scale bar: 40 µm.

Table S1. PCR primer sequences

Xenopus laevis **qPCR primers**		
Gene	**Forward primer**	**Reverse primer**
Gli3	GGCCCCCACCAACACCACTG	CCGTGGGACATTGACCGAAGGA
Patched1	CAGCTGCCCAGCCGAGGGTA	GGGCGAAATTGGCATCGCAGTA
ODC	GCTTCTGGAGCGGGCAAAGGA	CCAAGCTCAGCCCCCATGTCA
RPL8	CCACGTGTCCGTGGTGTGGCTA	GCGCAGACGACCAGTACGACGA
Sfrp1	CAGTGAGACAATGGCGGAGGTGAA	GGGGCGAAGAGAGAGCACAGGA
Xenopus tropicalis **qPCR primers**		
Gene	**Forward primer**	**Reverse primer**
Patched1	CAGCTGCCCAGCCGAGGGTA	TCCTGGTCAGGCGGCGCTACTA
ODC	CATGGCATTCTCCCTGAAGTACCAGAA	GGACAGATGGTAGGGGCAAGCTCA
RPL8	CGCCACCGTTATCTCCCACAATC	CCACCAGCAACAACCCCAACA

CHAPITRE VI : ANALYSE FONCTIONNELLE DE YAP DANS LES CELLULES SOUCHES ET LES PROGENITEURS DE LA RETINE POST-EMBRYONNAIRE

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

En parallèle du projet sur l'interaction des voies Wnt/Hedgehog, j'ai eu la chance de pouvoir initier un nouveau projet au laboratoire ayant pour but d'agrandir le réseau de signalisation responsable de la maintenance et de la prolifération des cellules souches de la rétine post-embryonnaire. La voie de signalisation Hippo s'est alors révélée être un candidat idéal pour compléter ce réseau. Au début du projet, cette voie était décrite dans la littérature comme jouant un rôle essentiel dans la régulation de la taille des organes au cours du développement en modulant à la fois la prolifération et la survie cellulaire. Quelques travaux suggéraient également que cette voie était impliquée dans le contrôle de la prolifération de certaines populations de cellules souches, comme les cellules souches intestinales (Shaw et al., 2010)(Karpowicz et al., 2010) ou encore les cellules souches embryonnaires (Lian et al., 2010) et qu'elle interagissait avec d'autres voies de signalisation, incluant les voies Wnt/Hedgehog (Fernandez-L et al., 2009)(Varelas, Miller, et al., 2010). Compte tenu de ces données, l'étude de la voie de signalisation Hippo paraissait incontournable dans le cadre de l'étude des mécanismes moléculaires régissant le comportement des cellules souches de la rétine. Cependant, lors de l'initiation du projet, aucune donnée n'était encore disponible sur cette voie chez le xénope. Un résultat encourageant obtenu chez le poisson montrait tout de même que la perte de fonction de *Yap* aboutissait à la formation d'embryons possédant une tête et des yeux de taille réduite (Q. Jiang et al., 2009). Quelques mois plus tard, les patrons d'expression *in toto* des deux effecteurs de la voie Hippo, *Yap* et *Taz* ont été publiés au cours du développement de *Xenopus tropicalis* (Nejigane et al., 2011) et venaient alors confirmer mes premiers résultats d'hybridation *in situ* réalisées durant mon stage de Master montrant que les différents composants du cœur de la voie était bien exprimés dans la rétine post-embryonnaire du xénope. Dans ce contexte, l'objectif premier de mon projet a donc été de comprendre le rôle de la voie de signalisation Hippo dans la rétine post-embryonnaire en se focalisant sur l'effecteur YAP.

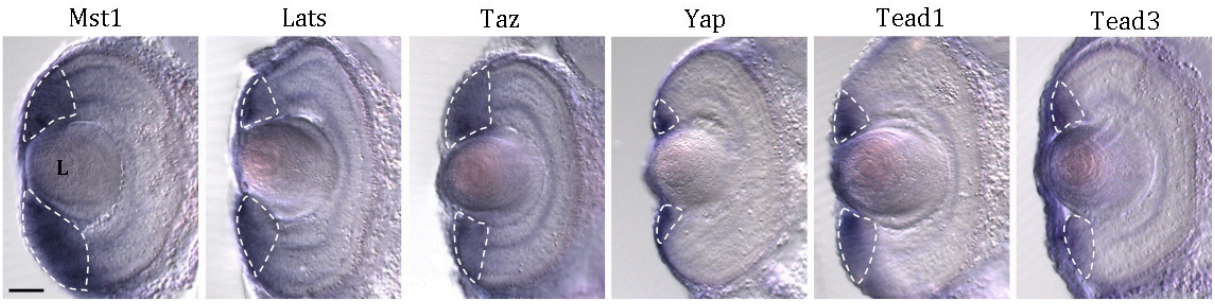


Figure 70: Patron d'expresssion des différents composants de la voie de signalisation Hippo chez *Xenopus laevis*. Coupes transversales de rétines au stade 40 réalisées après une hybridation *in situ* avec les différentes sondes indiquées au-dessus de chaque photo. Les lignes en pointillées délimitent l'aire d'expression des différents gènes analysés. La barre d'échelle représente 40µm. L: lens.

Publication associée à ce chapitre (prévue en décembre):

Cabochette P, Vega-Lopez G, Bitard J, Parain K, Chemouny R, Masson C, Hedderich M, Henningfeld K, Borday C, Locker M, Bronchain O, Perron M. YAP controls retinal stem cell DNA replication timing and genomic stability.

2. RESUME DES PRINCIPAUX RESULTATS

1) Analyse de l'expression des composants de la voie de signalisation Hippo dans la rétine post-embryonnaire

Etant donné l'absence de données dans la littérature concernant la voie de signalisation Hippo dans la rétine des amphibiens, la première étape de ce projet a été d'identifier les différents composants de la voie chez *Xenopus laevis* et d'analyser leurs patrons d'expression. Des expériences d'hybridation *in situ* ont ainsi montré que les différentes kinases de la voie *Mst1* et *Lats,* les facteurs de transcription *Tead1* et *Tead3,* ainsi que le co-activateur *Taz* sont exprimés de façon diffuse dans toute la ZMC incluant à la fois les cellules souches et des progéniteurs rétiniens (Figure 70). De façon intéressante, contrairement à *Taz*, *Yap* s'exprime fortement et de façon très restreinte dans la région la plus périphérique contenant les cellules souches (Figure 70). Ce patron d'expression suggère donc que *Yap* pourrait jouer un rôle dans le comportement des cellules souches rétiniennes. Ces résultats nous ont donc poussé à mettre de côté l'étude fonctionnelle de *Taz* pour nous focaliser sur celle de *Yap*. Nos résultats identifient *Yap* comme un nouveau marqueur des cellules souches de la rétine post-embryonnaire.

2) Etude du rôle de *Yap* dans les cellules souches de la rétine post-embryonnaire

L'étude fonctionnelle de *Yap* dans la rétine post-embryonnaire a été initié par des approches de gain et de perte de fonction. La surexpression de *Yap* provoque des phénotypes d'excès de croissance, particulièrement visibles au niveau de la tête et des yeux des têtards injectés. En

accord avec les données de la littérature, ce phénotype est associé à une diminution de la mort cellulaire et une augmentation de la prolifération dans la rétine post-embryonnaire. Au contraire, la perte de fonction de *Yap* aboutit à une forte réduction de la taille des yeux associée une réduction de l'incorporation d'EdU dans la rétine post-embryonnaire. La mise au point d'une nouvelle technique de Morpholinos inductibles chez le xénope nous a permis de démontrer que ce phénotype était bien du à un effet de *Yap* durant les stades post-embryonnaires et non à d'éventuels défauts développementaux précoces. De plus, des expériences de transplantation de vésicules optiques nous ont permis de démontrer le caractère tissu-autonome de ce phénotype de petit œil.Le phénotype de diminution de l'incorporation d'EdU observé après une perte de fonction du gène *Yap* nous a conduit à proposer une première hypothèse selon laquelle *Yap* pourrait être un facteur essentiel dans le maintien de la population de cellules souches rétiniennes dans laquelle il s'exprime. La disparition de cette population de cellules pourrait en effet réduire progressivement le nombre de progéniteurs en prolifération au sein de la ZMC et donc expliquer l'observation d'une diminution de l'incorporation d'EdU dans nos expériences. Plusieurs observations sont venues contredire cette hypothèse: Après une perte de fonction *Yap*: (*i*) les différents marqueurs de cellules souches connus sont toujours exprimés, (*ii*) le nombre de cellules au sein de la ZMC ne change pas et (*iii*) l'expression de la protéine PCNA, marqueur de l'ensemble des cellules en prolifération quelque soit la phase du cycle cellulaire dans laquelle elle se trouve, n'est pas modifié. Ces résultats nous ont donc amené à comprendre comment une réduction de l'incorporation de l'EdU pouvait être observée si toutes les cellules de la ZMC étaient bien présentes et continuaient de proliférer?

2.1 La perte de fonction de Yap *provoque un raccourcissement de la phase S du cycle cellulaire des cellules souches de la rétine post-embryonnaire*

L'hypothèse pouvant répondre à cette question et que YAP pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la cinétique du cycle cellulaire des cellules souches de la rétine. Etant donné que l'EdU s'incorpore durant la phase S du cycle cellulaire, deux hypothèses jouant sur la cinétique du cycle peuvent expliquer notre phénotype:

- soit l'inhibition de *Yap* provoque un allongement des phases G1 et G2 réduisant ainsi la probabilité de marquer les cellules avec de l'EdU durant un temps court d'incorporation.

- soit l'inhibition de *Yap* raccourcie la durée de la phase S réduisant également la probabilité de marquer les cellules dans cette phase.

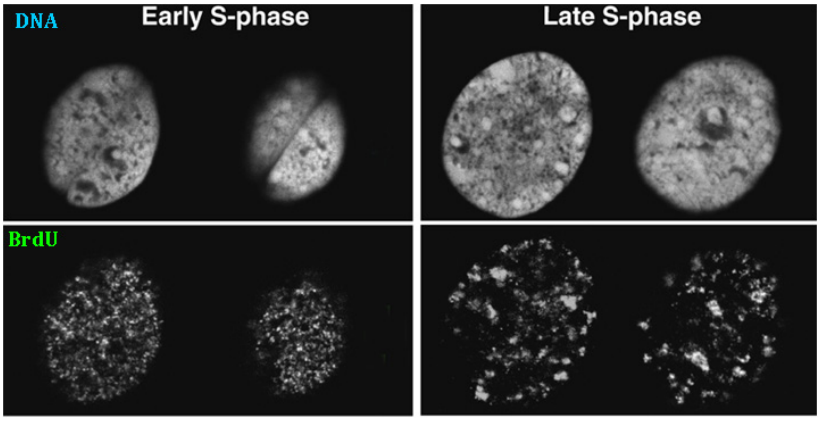


Figure 71: Organisation des foyers de réplication au cours de la phase S du cycle cellulaire. Immunomarquage utilisant un anticorps anti-BrdU après une incorporation de 30min sur des cellules en culture (en bas). La figure montre le marquage obtenu sur des cellules en début de phase S (à gauche) et en fin de phase S (à droite). L'ADN des cellules est également visualisé grâce à un marquage TO-PRO3. D'après (Casas-Delucchi et al., 2011).

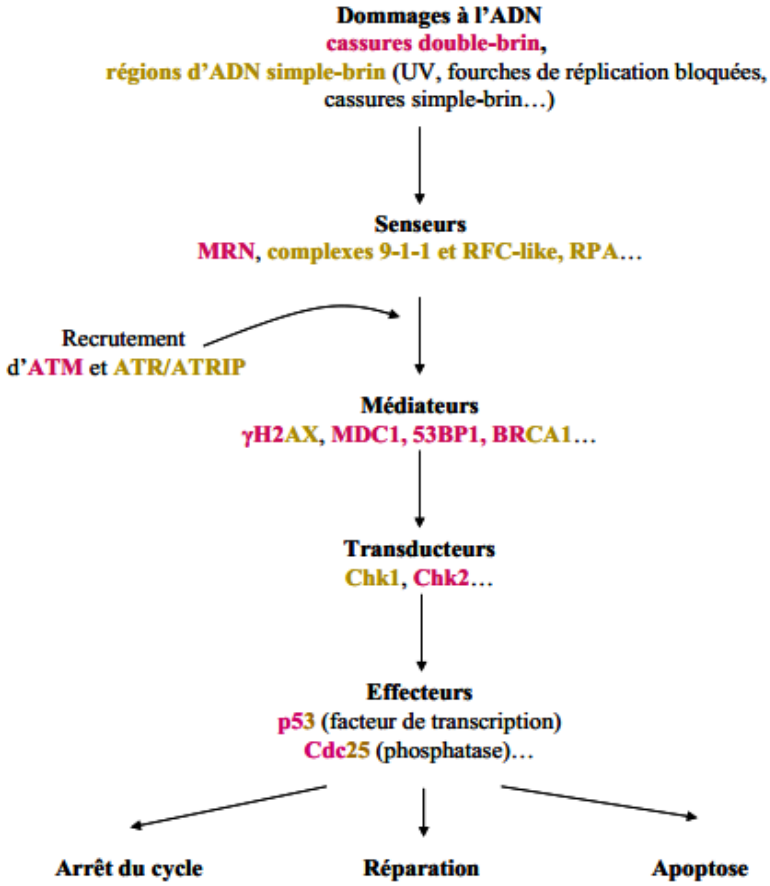


Figure 72: Organisation générale de la réponse cellulaire aux dommages de l'ADN. La réponse aux dommages de l'ADN commence par la détection de la lésion par des senseurs (en rose, réponse spécifique des cassures double-brins; en marron, des cassures simple-brins). Ces senseurs permettent de recruter rapidement les kinases ATM et ATR qui sont responsables de la phosphorylation de H2AX et donc de la formation de foci, consécutifs au recrutement de nombreux médiateurs. L'amplification du signal qui en résulte permet l'activation des transducteurs, principalement des kinases, qui à leur tour, activent ou inhibent les effecteurs de la réponse cellulaire. Leur action définit la nature de cette réponse: arrêt du cycle, réparation et/ou mort cellulaire.

L'analyse du cycle cellulaire des cellules de la ZMC et plus spécifiquement des cellules souches *in vivo* grâce à des expériences d'EdU cumulatif révèle en effet que l'inhibition de *Yap* provoque une augmentation de la longueur totale du cycle cellulaire principalement dû à un allongement de la phase G1. Cependant, nous avons également observé un raccourcissement important de la longueur de la phase S. Ce dernier résultat étonnant suggère que l'absence de *Yap* raccourcit le processus de réplication de l'ADN des cellules souches rétiniennes. Une modification du nombre d'origines de réplication activées pourrait expliquer ce raccourcissement.

La réplication des chromosomes débute en de très nombreux sites sur l'ADN appelés origines de réplication. L'activation différée de ces différents sites est un processus finement régulé dans le temps au cours de la phase de synthèse qu'il est possible de visualier. En effet, la distribution ainsi que la taille et la forme des foyers de réplication changent au cours de la phase S (Figure 71). Au début de cette phase, les foyers sont répartis dans l'ensemble du noyau et sont de petite taille alors qu'au contraire, en fin de phase S, ils se concentrent en gros granules beaucoup moins nombreux. Dans un contexte de perte de fonction du gène *Yap*, cette analyse a permis de montrer une très forte réduction du nombre de cellules présentant un profil de réplication "tardif", suggérant une accélération du programme de réplication. L'identification des mécanismes moléculaires pouvant expliquer cette réduction de la longueur de la phase S nous a conduit à nous intéresser au gène *c-Myc*, dont la surexpression est décrite dans la littérature comme responsable de la suractivation des origines de réplication (Dominguez-Sola et al., 2007). Dans notre modèle, une importante augmentation de l'expression de ce gène a été observé dans la ZMC des têtards morphants *Yap*.

2.2 La perte de fonction du gène Yap *à l'origine d'instabilités génomiques dans les cellules de la ZMC.*

Un défaut dans la coordination des événements qui contrôlent le programme temporel de réplication perturbe le maintien de l'intégrité du génome. L'ensemble des résultats précédents nous ont donc conduit à émettre l'hypothèse que l'inhibition de *Yap* pourrait être à l'origine de dommages de l'ADN conduisant à l'activation de la "replication stress pathway" ATR/ATM/p53 (Ataxia Telangiectasia and RAD3 related)(Ataxia Telangiectasia mutated)(Figure 72). En cas d'anomalies, l'activation de cette voie constituée de plusieurs médiateurs comme l'histone γH2AX (Histone 2A family, member X) déclenche les processus de réparation ou de mort cellulaire. En accord avec cette hypothèse, nos résultats montrent que l'inhibition de *Yap* induit une augmentation de l'expression de l'histone γH2AX. ainsi que du nombre de cellules en apoptose dans la ZMC.

2.3 Identification des acteurs moléculaires à l'origine du phénotype de perte de fonction de Yap.

La réalisation d'une expérience de nanostring en condition de perte de fonction *Yap* nous a permis d'identifier certains acteurs moléculaires qui pourraient être en partie responsable du phénotype obtenu. Les résultats montrent en particulier une forte augmentation de l'expression des gènes *p53* et *p21*. p53 possède de nombreuses fonctions cellulaires, il est notamment un composant essentiel de la "replication stress pathway" décrite précédemment. Dans ce contexte, son activation est responsable de l'induction de la mort cellulaire en cas de détection de dommages de l'ADN sévères. Il pourrait ainsi être à l'origine de l'apoptose observé dans la ZMC suite à une inhibition de *Yap*. Enfin, p21 est un membre de la famille Cip/Kip et l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire en inhibant la transition G1-S en réponse à divers stress cellulaires. L'augmentation de son expression pourrait donc expliquer l'augmentation de la durée de la phase G1.

3) Identification des partenaires de YAP dans la rétine post-embryonnaire

Enfin, l'objectif de la dernière partie de ce projet a été de comprendre le mode d'action de YAP en identifiant son (ou ses) différents partenaire(s) dans la rétine post-embryonnaire. YAP ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN et doit donc se lier à divers facteurs de transcription afin de réguler la transcription de ses gènes cibles. La recherche de partenaires candidats nous a conduit à l'étude d'un autre facteur de transcription, PKNOX1 (Pbx/knotted-1 homeobox) aussi connu sous le nom PREP1 (Pbx regulating protein-1). Ce facteur de transcription de la famille Meis/Prep, connu dans la littérature comme un facteur impliqué dans le maintien de la stabilité génomique (Iotti et al., 2011) est l'homologue d'*Homothorax* chez la drosophile, connu pour interagir avec l'homologue de YAP (Peng et al., 2009b). La caractérisation fonctionnelle de ce candidat a permis de monter que: (*i*) *Pknox1* s'exprime au sein de la zone des cellules souches de la rétine post-embryonnaire, (*ii*) que sa perte de fonction conduit à un phénotype similaire à celui obtenu lors de la perte de fonction *Yap*, (*iii*) que *Yap* et *Pknox1* agissent de façon synergique sur la prolifération des cellules de la ZMC, et enfin, (*iv*) que ces derniers interagissent physiquement *in vitro*.

3. CONCLUSION

Nos données montrent que YAP est exprimé dans les cellules souches de la rétine post-emrbyonnaire et qu'il interagit fonctionnellement avec le facteur de transcription PKNOX1. Ces deux facteurs sont capables d'interagir physiquement l'un avec l'autre *in vitro*. Les résultats de l'analyse fonctionnelle de YAP montrent que ce facteur est essentiel au maintien du bon déroulement du programme temporel de la phase S des cellules souches rétiniennes et du maintien de leur stabilité génomique. Cette caractéristique particulière de posséder une longue phase de réplication est observée dans différentes populations de cellules souches. Ce processus est souvent interprété dans la littérature comme une précaution que ces cellules acquièrent afin d'assurer la qualité de leur synthèse d'ADN et de limiter la transmission de mutations à leur descendance. L'ensemble de nos données suggère donc que le complexe YAP/ PKNOX1 pourrait être essentiel à ce contrôle indispensable.

Article n°2

Pauline Cabochette*, Guillermo Vega-Lopez*, Juliette Bitard, Karine Parain, Romain Chemouny, Christel Masson, Marie Hedderich, Kris Henningfeld, Caroline Borday, Morgane Locker, Odile Bronchain, Muriel Perron

YAP controls retinal stem cell DNA replication timing and genomic stability.

YAP controls retinal stem cell DNA replication timing and genomic stability

Pauline Cabochette *[1], Guillermo Vega-Lopez *[1], Juliette Bitard[1], Karine Parain[1], Romain Chemouny[1], Christel Masson[1], Marie Hedderich[2], Kristine Henningfeld[2], Caroline Borday[1], Morgane Locker[1], Odile Bronchain[1§], Muriel Perron[1§]

* co-first authorship

§ co-senior authorship

Affiliation:

[1] UPR CNRS 3294, Neurobiology and Development, Université Paris-Sud, 91405 Orsay, France

[2] University of Goettingen, Institute of Developmental Biochemistry, Center for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain (CNMPB), 37077 Goettingen, Germany

Contact information:

muriel.perron@u-psud.fr; odile.bronchain@u-psud.fr

Running Title:

YAP in retinal stem cells

Summary

The adult frog retina retains a reservoir of active neural stem cells that contribute to continuous eye growth throughout life. We found that *Yap*, a downstream effector of the Hippo pathway, is specifically expressed in these stem cells. *Yap* knock-downleads to an accelerated S-phase, a phenotype likely mediated by upregulation of *c-Myc*. This is associated with an increased occurrence of DNA damage and eventually p53-p21 pathway-mediated cell death. Finally, we identified PKNOX1, a transcription factor involved in the maintenance of genomic stability, as a functional and physical interactant of YAP. Altogether, we propose that YAP is required in adult retinal stem cells to regulate the temporal firing of replication origins and quality control of replicated DNA. Our data reinforce the view that specific mechanisms dedicated to S-phase control are at work in stem cells to protect them from genomic instability.

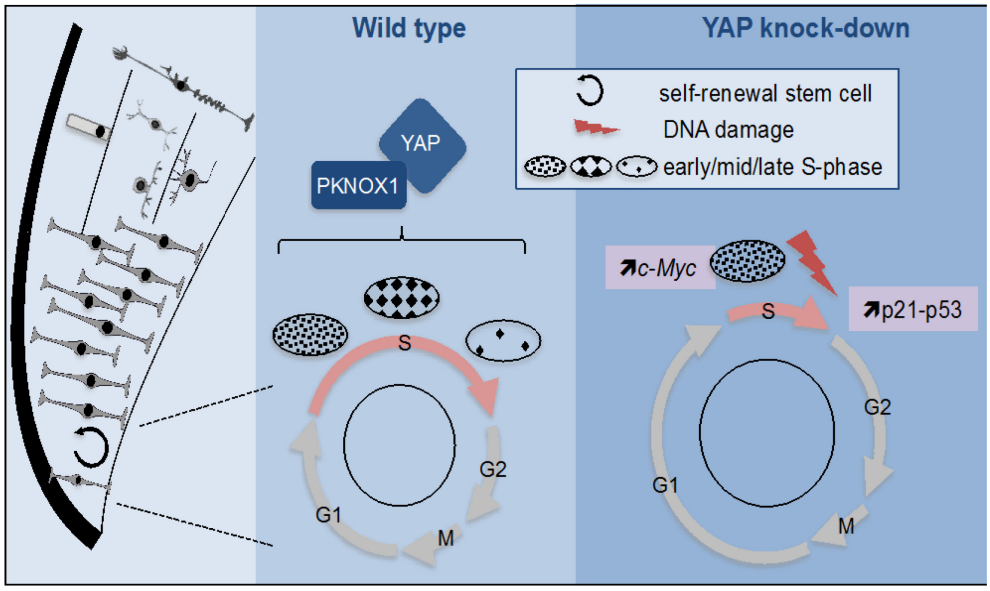
Highlights

- YAP expression in retinal stem cells is required for post-embryonic retinal growth
- YAP regulates retinal stem cell DNA replication timing program
- YAP is crucial for the maintenance of genomic stability
- YAP functionally and physically interacts with PKNOX1

eTOC Blurb

Resident neural stem cells of the frog retina allow for continuous post-embryonic retinal growth. Based on loss of function analyses, the authors propose a model where YAP, the effector of the Hippo pathway, would control the temporal replication program in S-phase. This would ensure genomic stability in retinal stem cells.

Graphical abstract



INTRODUCTION

Adult stem cell maintenance is required to sustain long-term preservation of tissue homeostasis. In the fish or amphibian retina, a continuously proliferating peripheral domain called ciliary marginal zone (CMZ) (Perron et al., 1998; Wetts et al., 1989) was recently formally demonstrated to contain genuine multipotent and self-renewing neural stem cells (Centanin et al., 2011). The CMZ not only ensures cell replacement, but also contributes to life-long growth of the eye through the permanent generation of all retinal cell types. The CMZ thus represents an ideal model for dissecting molecular cues underlying retinal stem cell properties *in vivo*. Such knowledge is essential for the development of innovative therapeutic strategies based on the mobilization and targeted activation of endogenous neural stem cells for tissue repair.

The Hippo pathway effector yes-associated protein (YAP) was identified as a major regulator of organ growth through its actions on embryonic precursor cells (Lian et al., 2010; Ramos and Camargo, 2012). YAP function in adult stem cells, however, remains unclear. For instance, *Yap* overexpression increases self-renewal of airway basal stem cells (Zhao et al., 2014). In contrast, it surprisingly leads to a loss of intestinal stem cells (Barry et al., 2013), while being seemingly neutral regarding the quantity and function of hematopoietic stem cells (Jansson and Larsson, 2012). Inactivation studies further suggested that *Yap* is largely dispensable in a physiological context for the homeostasis of several adult organs such as the mammary gland, pancreas or intestine (Azzolin et al., 2014; Cai et al., 2010; Chen et al., 2014; Zhang et al., 2014). *Yap* is however implicated in tissue regeneration but its effects are controversial (Barry et al., 2013; Cai et al., 2010). Thus, the role of YAP in vertebrate adult stem cells may likely be context-dependent and clearly deserves further investigation. Since its function in adult neural stem cells is presently unknown, we took advantage of the *Xenopus* CMZ model system and investigated whether *Yap* is involved in the maintenance of an active pool of retinal stem cells in the continuously growing post-embryonic frog eye. Although YAP gain of function led quite expectedly to CMZ cell overproliferation, the loss of function analysis revealed a more complex phenotype. Indeed, we found that stem cells were still present but exhibited aberrant cell cycle progression. In particular, DNA replication timing was found to be altered leading to a dramatic S-phase shortening. This correlates with increased DNA damage and eventually cell death. We also found that YAP functionally and physically interacts with PKNOX1, a transcription factor required to maintain genomic stability (Iotti et al., 2011a).

RESULTS

Yap is expressed in slow dividing stem cells of the post-embryonic retina

In situ hybridization revealed that in the post-embryonic retina, *Yap* is expressed in the most peripheral stem cell-containing region of the CMZ (Figure 1A, B). We also performed immunostaining using an antibody whose specificity was assessed in a loss of function background, *i.e.* in tadpoles injected with *Yap* Morpholinos (*Yap*-MO; Figure S1A; see also Figure S1B-D for efficiency and specificity evaluation of *Yap*-MO). YAP protein could be detected in both the nuclei and cytoplasm of stem cells located at the tip of the CMZ. Of note, we also found YAP labeling in Müller glial cells (Figure 1C). To delineate more precisely the *Yap* expression domain, we co-labeled *Yap* and proliferative cells (Figure 1D). A short EdU pulse was performed allowing slow dividing stem cells to be distinguished from fast proliferating transit amplifying progenitors in the CMZ (Xue and Harris, 2011). *Yap* staining was found to be prominent in EdU-negative stem cells and in the most peripheral EdU-positive cells (young progenitors). The staining then waned in more central older progenitor cells. Together, these findings underscore the efficacy of both the YAP antibody and *Yap*-MO as well as highlight the presence of YAP in post-embryonic retinal stem cells within the CMZ.

Yap overexpression promotes post-embryonic eye overgrowth

To investigate *Yap* function in the post-embryonic retina, we first undertook a gain of function approach by the means of mRNA injection at the two-cell stage. *Yap*- overexpressing tadpoles displayed eye overgrowth on the injected side (Figure 1E, F). This phenotype prompted us to analyze the impact of *Yap* on both cell death and proliferation. We found that *Yap* overexpression results in both a decreased number of TUNEL positive cells (Figure 1G, H) and a dramatic expansion of the EdU-positive cell population (Figure 1I, J). The overproliferative phenotype was strongly exacerbated upon overexpression of a *Yap* mutant construct where Ser-98 was replaced by an alanine (Yap^{S98A}) (Figure 1I). This residue (Ser-127 in mammalian YAP) is a conserved Lats phosphorylation site that has been shown to mediate the growth-suppressive output of the Hippo signaling cascade *in vivo* (Zhao et al., 2007). Together, these data reveal that *Yap*-dependent retinal overgrowth is likely caused by enhanced cell survival and cell proliferation.

Yap knockdown reduces post-embryonic eye size

We next sought to determine whether *Yap* is essential for post-embryonic retinal growth by knocking it down using *Yap*-MO. The Morpholino concentration was chosen to efficiently decrease YAP quantity (as inferred fromWestern-blot analysis Figure S1B), while avoiding previously described early embryonic defects (Gee et al., 2011). In these conditions, morphant tadpoles developed but exhibited significantly reduced eye size compared to controls (Figure 2A,B). Importantly, this

phenotype was restored upon co-injection of *Yap*-MO with non-targetable *Yap* mRNAs, demonstrating specificity (Figure S1C). To exclude potential growth impairment at the level of the whole organism and assess the tissue autonomy of eye size defects, we performed optic vesicle isotopic and isochronic graft experiments (Figure 2C). When the optic vesicle of a control tailbud was transplanted into an enucleated morphant embryo, it nevertheless reached a normal size. In contrast, *Yap*-MO optic vesicles grafted in a control host generated smaller eyes, which is in accordance with *Yap* knockdown effects being eye autonomous.

Finally, to address whether the reduced eye size was due to abnormal embryonic morphogenesis or to post-embryonic growth defects, we adapted in *Xenopus* the use of photo-cleavable Morpholinos (photo-MO). This technology, previously set up in zebrafish (Tallafuss et al., 2012), allows for an inducible orreversible control of gene knockdown through UV-induced cleavage of either sense or antisense photo-MOs (see details in Figure S2A). We found that restoring YAP function at late embryogenesis, following knockdown during development, leads to tadpoles with normal sized eyes (Figures 2B and S2B-D). This supports the hypothesis that the *Yap*-MO phenotype is not the indirect consequence of developmental morphogenetic defects. In line with this, conditional *Yap* knockdown starting at late retinogenesis was found to be sufficient to obtain embryos displaying a small eye phenotype (Figures 2B and S2B, E, F). Together, these data point to a specific role for YAP in the homeostatic control of post-embryonic retinal growth.

***Yap* knockdown impedes retinal stem cell proliferative activity**

To investigate the cause of eye size reduction in *Yap* morphant tadpoles, we determined the level of proliferation within the CMZ. *Yap*-MO-injected tadpoles harbored a significantly decreased number of EdU^+ cells compared to a control situation (Figure 2D, E). The same was true when *Yap* knockdown was conditionally induced from late embryogenesis (Figure S3). The difference in EdU-labeling between control and *Yap* morphant tadpoles was even more pronounced at the tip of the CMZ where stem cells reside and *Yap* expression is the strongest (Figure 2E). We thus reasoned that *Yap* knockdown might decrease the number of proliferative cells in the CMZ as a consequence of stem cell depletion. Using *in situ* hybridization, we examined the expression of several retinal stem and progenitor cell markers. Surprisingly, stainings observed in *Yap*-MO-injected tadpoles were similar to control ones, indicating that both stem and progenitor cell populations were still present (Figure 2F and data not shown). Accordingly, neither the total number of cells within the CMZ nor the size of the proliferative cell population (PCNA labeled) was significantly affected (Figure 2G-J). Together, these data indicate that *Yap* knockdown does not induce stem/progenitor cell exhaustion but rather alters the relative proportion of time these cells spend in S-phase of the cell cycle.

***Yap* loss of function affects cell cycle progression within the CMZ**

The observed phenotype suggests that cell cycle kinetics of retinal stem/progenitor cells is perturbed in morphant tadpoles. As a first global approach to test this hypothesis, we evaluated the mitotic index in the whole post-embryonic CMZ using the mitotic marker phospho-histone H3 (PH3; Figure 3A, B). We found that compared to the control, *Yap* knockdown results in a significantly lower percentage of mitotic cells per section, which is suggestive of a longer total cell cycle length. To further investigate cell cycle progression defects at the level of the whole CMZ, we then measured G2 length using the percentage of labeled mitosis (PLM) paradigm (Cai et al., 1997; Locker et al., 2006; Quastler and Sherman, 1959) (Figure 3C-E). As expected from the asynchrony among retinal cells in the CMZ, the percentage of PH3/EdU-labeled cells increased sigmoidally with increasing EdU exposure times, before reaching a plateau (Figure 3E). Noticeably, the PLM was consistently lower at each time point in *Yap* morphant retinas compared to control ones, indicating a delayed S- to M-phase progression. We estimated that the mean G2 length (T_{G2}; see Experimental Procedures for details) doubled in *Yap* morphant retinas compared to the control (from approximately 2 to 4 hours). It thus appears that *Yap* knockdown results in perturbed cell cycle kinetics within the CMZ.

***Yap* loss of function affects S-phase duration in retinal stem cells**

In order to specifically measure total cycle length (T_C) of retinal stem cells, we next turned to a cumulative labeling assay (Nowakowski et al., 1989), a well-established technique that also allows evaluating S-phase (T_S) length (see Experimental Procedures for details). As shown in Figure 3F, the labeling index (LI) in the linear part of the curve was consistently lower in *Yap* morphant retinal stem cells compared to control ones. Calculation of T_C confirmed the hypothesis of extended cell cycle duration following *Yap*-Mo injection. Surprisingly, it also revealed a dramatic reduction of S-phase length in morphant cells (Figure 3G).

Such unexpected S-phase shortening prompted us to further investigate the underlying molecular mechanisms. In eukaryotes, origins of replication are activated throughout the S-phase in a temporally controlled manner such that some origins fire early and others fire late. The *c-Myc* proto-oncogene has been shown to accelerate S-phase by inducing premature origin firing initiation and increasing origin density (Robinson et al., 2009; Srinivasan et al., 2013). *In situ* hybridization analysis and Q-PCR revealed an upregulation and expansion of *c-Myc* expression in the CMZ of the *Yap* morphant retina (Figure 4A-C). This may account, at least in part, for the S-phase length shortening. To strengthen this hypothesis, we examined EdU-labeled replication foci at the tip of the CMZ. Their abundance and distribution, as classically observed in synchronized cultured cells, are indeed known to differ between early (numerous small foci located throughout the nucleus) and mid/lateS-phase (limited number of large foci; Figure 4D) (van Dierendonck et al., 1989; Koberna et al., 2005). In the control situation, we found both early and late patterns within the stem cell population of the CMZ. In contrast, the

proportion of cells in mid/late S-phase was dramatically reduced in *Yap* morphant cells (Figure 4E, F). Altogether, these data highlight that loss of YAP function in retinal stem cells alters their temporal program of DNA replication and pointsto *c-Myc* as a potential actor in this process.

***Yap* loss of function induces DNA damage**

DNA replication stress results in DNA damage and consequent genomic instability (Zeman and Cimprich, 2014). We thus examined the expression of phosphorylated histone H2AX (γ-H2AX), the most sensitive marker for DNA double-strand breaks. The number of γ-H2AX-positive cells was significantly increased in *Yap*-MO-injected CMZ compared to controls (Figure5A, B). Since extensive DNA damage may trigger apoptosis, we next turned to a TUNEL assay and found that cell death was indeed severely increased in morphant retinas (Figure 5C, D). Surprisingly, the majority of apoptotic cells was found at "the exit" of the CMZ close to the neural retina, and not in its most peripheral part where *Yap* is expressed. This strongly suggests that apoptosis occurs as a secondary consequence in late progenitor cells generated from stem cells that experienced YAP function inhibition.

As stated above, the number of CMZ cells is not significantly changed in *Yap* morphant tadpoles and therefore retinal growth impairment cannot be simply explained by a depletion of the stem/progenitor pool. To foresee whether the increased cell death at the "exit" of the CMZ could contribute to the reduced eye size, proliferating CMZ cells were pulse-labeled and their progeny chased and counted in the three retinal layers (Figure 5E). As expected, we found that fewer neurons were generated in a 2-day period in *Yap* morphant retinas compared to control ones (Figure 5F).

***Yap* knock-down in the CMZ activates the p53-p21 pathway**

In order to gain additional insight into the molecular mechanisms underlying the *Yap* knockdown phenotype, we analyzed the expression of 16 genes encoding cell cycle regulators using the NanoString technology. Among them, only *p53* and $p21^{Cip1/WAF1}$(previously named *Xic2* in *Xenopus* and *p21* hereafter) were significantly affected, with much higher levels present in *Yap* morphant retinas compared to control ones (Figure 5G). The tumor suppressor protein *p53* is activated in response to a variety of cellular stresses (including DNA damage) and triggers cell cycle arrest or apoptosis. *In situ* hybridization analysis revealed that its expression in the wild type retina is restricted to the CMZ. In addition and consistent with the NanoString data, *p53* staining was strongly enhanced in the CMZ of *Yap*-MO-injected tadpoles (Figure 5H). p21 is a member of the CIP/KIP family of cyclin-dependent kinase inhibitors that blocks the G1-S transition and has emerged as a key player in the p53 pathway (Attardi and DePinho, 2004). Since it was previously described as a lens-specific marker in the *Xenopus* eye (Daniels et al., 2004), we asked if it is linked with the observed CMZ phenotype. We thus performed *in situ* hybridization and observed a strong ectopic *p21* labeling within the CMZ of *Yap* morphant tadpoles (Figure 5H). As a whole, these results suggest that increased

apoptosis and probably delayed cell cycle progression resulting from *Yap* knockdown might be driven by the p53-p21 pathway.

PKNOX1 is a novel partner of YAP in the retina

YAP is a co-transcriptional activator that functions in association with transcription factors such as its classical partners of the TEAD family. Among other interacting factors described so far is *Drosophila* Homothorax (Peng et al., 2009; Zhang et al., 2011). Interestingly, PKNOX1 (also named Prep1), a mammalian Homothorax ortholog belonging to the Meis/Prep homeodomain factor family, has recently been involved in the maintenance of genomic stability (Iotti et al., 2011a). However, its physical interaction with YAP has not yet been reported in vertebrates. We found that the two proteins indeed interacted *in vitro* using a two-hybrid assay (data not shown). In order to address whether they might do so *in vivo* as well, we performed a bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiment (Figure 6A) (Ohashi and Mizuno, 2014). In this purpose, constructs encoding YAP, PKNOX1 or TEAD1 (as a positive control for interaction with YAP) fused to either the amino or carboxyl-terminal fragment of the VENUS fluorescent protein were transfected in HEK293T cells (Figure 6B and data not shown for inverse VN/VC fusions combinations). As expected, co-transfection of *Yap* and *tead1* constructs resulted in a significant nuclear BiFC signal. This was lost using a *Yap*Δ*TBS* mutant devoid of TEAD binding site, validating the specificity of the BiFC staining. Co-transfection of both *Yap* and *pknox1* constructs led to a positive BiFC signal that mainly localized to the cytoplasm. YAP/PKNOX1 interaction was further confirmed by co-immunoprecipitation analyses following misexpression of tagged proteins (Figure 6C).

Since we found that *pknox1* is expressed in the CMZ (Figure 7A), we next sought for potential functional interaction with YAP in retinal stem cells. A loss of function approach was first undertaken to compare *Yap* and *pknox1* knockdown phenotypes. The injected dose of *pknox1*-MO was adapted to avoid broad developmental defects (see Figure S4 for validation of *pknox1*-MO specificity and efficiency). Although the eye phenotype appeared more dramatic than that observed upon *Yap* knockdown (layering defects of the retina), it similarly led to a significant reduction in total eye size (Figure 7B, C), associated with decreased EdU incorporation in the CMZ compared to controls (Figure 7D, E). We then asked whether YAP and PKNOX1 might synergise in a co-overexpression assay. Of note, *pknox1* overexpression alone does not significantly affect CMZ cell proliferation. The injected dose of *Yap* mRNA was lowered so that it only leads to a moderate, although significant, increase in the number of EdU-labeled cells. In these conditions, *pknox1* mRNA injection was found to exacerbate *Yap* gain of function phenotype (Figure 7F, G). Finally, we tested whether *pknox1* knockdown might rescue the overproliferative effects of *Yap* misexpression. We found indeed that EdU incorporation was restored to a basal level in a *pknox1* morphant context (Figure 7H, I).

Together, these data support the idea that PKNOX1 physically and functionally interacts with YAP in the CMZ.

DISCUSSION

Long-term maintenance of tissue homeostasis relies on the fine-tuning of adult stem cell activity. Our knowledge regarding the molecular basis sustaining somatic stemness features is still very limited but may have important implications for regenerative medicine and cancer therapy. In the present study, we identified YAP, a downstream effector of the Hippo pathway, as a stem cell specific marker required for homeostatic growth of the frog post-embryonic retina. Our *in vivo* loss of function approach unexpectedly revealed a novel role for YAP in governing DNA replication timing of retinal stem cells. We propose a model in which this function would contribute to the maintenance of their genomic stability.

The ability of nuclear YAP to expand stem/progenitor cell populations has been established in numerous model systems (Barry and Camargo, 2013; Piccolo et al., 2014). However, the mechanisms underlying altered cell proliferation (changes in cell cycle length and/or re-entry) are rarely investigated in detail. In the developing neural tube for instance, YAP-driven increase in neural progenitor cell number has been proposed to result from accelerated cell cycle progression but whether its loss of function alters cell cycle kinetics as well remains an open question (Cao et al., 2008; Zhang et al., 2012). As observed in other adult organs in mammals (Azzolin et al., 2014; Chen et al., 2014; Zhang et al., 2014), our results suggest that *Yap* is dispensable for the maintenance of the stem cell pool. We instead uncovered that its depletion lengthens retinal stem cell divisions. However, to our surprise, this is associated with a dramatic shortening of their S-phase. DNA replication is a tightly regulated process that follows a strict temporal program. Our observation that *Yap* knockdown results in a mark reduction of late S-phase labeling patterns can suggest that some firing origins have advanced their activation timing, which may account for the reduced S-phase duration. The genetic control of DNA replication temporal progression has not been elucidated yet and there are thus very few examples in the literature where gene perturbation leads to a deregulation of S-phase duration (Aparicio, 2013; Yamazaki et al., 2013). Beyond its well-characterized transcriptional activity, it was reported that c-Myc exerts a non-transcriptional control on DNA replication. Its overexpression indeed causes increased replication origin activity and consequent S-phase shortening (Dominguez-Sola et al., 2007; Robinson et al., 2009; Srinivasan et al., 2013). Intriguingly, in contrast to *Drosophila* or cancer cells, where *c-Myc* has been reported to be positively regulated by *Yap* (Neto-Silva et al., 2010; Stocker, 2011; Xiao et al., 2013), we found that its expression is enhanced in the CMZ of *Yap*

morphant tadpoles. Although the underlying mechanism deserves further investigation, this raises the hypothesis that *c-Myc* may contribute to the S-phase defects caused by *Yap* knockdown.

Replication stress is a source of DNA damage, which may ultimately trigger activation of the p53-p21 pathway (Bartek and Lukas, 2001). As observed following *c-Myc* overexpression in *vitro* (Dominguez-Sola et al., 2007; Robinson et al., 2009; Srinivasan et al., 2013), we found an increased occurrence of double-strand breaks in *Yap* morphant retina, associated with an upregulation of both *p53* and *p21*. Since p21 is known to inhibit G1/S and G2/M transitions and p53 to induce programmed cell death (Vogelstein et al., 2000), this could account for both the lengthening in G phases (as deduced from both longer T_C and reduced T_S) and the increased number of apoptotic cells.

These findings raise key questions regarding specific features of stem cell biology. In addition to unique properties (such as the ability to self renew), emerging evidence suggests that somatic stem cells also differ from progenitor cells in the way they regulate basic cellular processes including their metabolic state (Burgess et al., 2014) or DNA-damage responses (Insinga et al., 2014). Regarding cell cycle progression, it has been shown during development that mammalian cortical neural stem cells exhibit a substantially longer S-phase than progenitors committed to neuron production (Arai et al., 2011). It was thus proposed that neural stem cells may need to invest more time during S-phase into quality control of replicated DNA. In agreement with this, we also found that CMZ retinal stem cells exhibit a longer S-phase compared to fast amplifying progenitors (data not shown). In addition, our work points for the first time towards a key factor, YAP, that may be involved in this stem cell specific regulation of S-phase. Although its precise function in this process remains to be investigated, it indeed appears to be required for proper choreography of the DNA replication program and may as such be necessary to maintain genomic integrity of retinal stem cells. Our findings also have important medical implications since aberrant DNA replication timing has been proposed to be a causative factor in diseases such as cancer and neuronal disorders (Aladjem, 2007; Donley and Thayer, 2013; Watanabe and Maekawa, 2010). Interestingly, another component of the Hippo pathway, LATS1, has very recently been involved in ATR-mediated response to replication stress in lung cancer cells (Pefani et al., 2014). Several Hippo pathway components may thus regulate (independently or in concert) S-phase progression and quality control and thereby safeguard genomic integrity.

Although *Homothorax* is known to partner the *drosophila Yap* homologue *Yorkie* in some developmental contexts (Peng et al., 2009; Zhang et al., 2011), this has not been reported yet for its vertebrate orthologs. Here, we provide biochemical and functional evidences supporting an interaction between PKNOX1 and YAP in the retina. PKNOX1 belongs to the TALE (three amino acids loop extension) class of homeodomain proteins and is involved in many developmental processes (Berthelsen et al., 1998; Ferretti et al., 2006). Down-regulation of *pknox1* in both zebrafish and mouse embryos lead toa small eye phenotype (Deflorian et al., 2004; Ferretti et al., 2006), reminiscent of

what we found in *Xenopus*. Interestingly, *pknox1* inactivation was reported to trigger cell death in the zebrafish CNS (Deflorian et al., 2004). Furthermore, *pknox1* deficiency leads to increased DNA damage and apoptosis both in embryonic fibroblasts and in the mouse epiblast (Fernandez-Diaz et al., 2010; Iotti et al., 2011b; Micali et al., 2009). On the basis of these different reports and our findings, we thuspropose that PKNOX1 and YAP interact together to maintain genomic stability in retinal stem cells. Whether this function holds true in other types of stem cells remain to be investigated.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

All animal care and experimentation were conducted in accordance with institutional guidelines, under an institutional license.

Plasmids and Morpholinos

The HA-tagged *Xenopus* constructs encoding wild-type or mutant YAP proteins (non-phosphorylable YAP^{S98A} or TEAD-binding site-deleted $YAP^{\Delta TBS}$) were provided by S. Gee and S. Moody (Gee et al., 2011) and subcloned into pCS2+. The *tead1* ORF, a gift from P. Thiébaud (Naye et al., 2007), was subcloned into pCS2+Flag. The *pknox1* (*prep1*, NM_001096382) full-length cDNA sequence was cloned by RT-PCR into pCS2+Flag. *Yap, pknox1* and *tead1* ORF were cloned in frame upstream the non-fluorescent N-ter or C-ter fragments of VENUS fluorescent protein (a gift from J. Smith) in HA-, myc- or flag-tagged pCS2+ (Saka et al., 2008). All primer sequences are available upon request. Translation-blocking antisense Morpholino oligonucleotides (MO, GeneTools) and Photo-Morpholinos (Photo-MO, GeneTools) used in this study are listed in Table S1.

mRNA and Morpholino microinjection

200 pg of mRNA (synthesized with mMessage mMachine kit, Life Technologies) or 2 pmol MO were injected in one or two blastomeres at the two-cell stage. mRNAs encoding ß-Galactosidaseor GFP were injected as controls and/or lineage tracers. In some experiments, the injected side was identified using the fluorescence of lissamine tagged-MO. Cleavage of antisense or sense Photo-MO was performed by exposing embryos/tadpoles to UV light (365 nm) for 10 minin a glass surrounded by aluminium. A ratio of 0.9:1 *Yap*-S-photo-MO to *Yap*-MO was used.

EdU labeling, immunostaining and TUNEL assay

Tadpoles were injected intra-abdominally with 1mM of 5-ethynyl-20-deoxyuridine (EdU, Invitrogen) and fixed at the required stage in 4% paraformaldehyde. For cumulative labeling experiments, EdU was made constantly available for the desired time-period following injection by incubating tadpoles in a 1mM EdU solution, renewed every other day. EdU incorporation was detected on paraffin sections using the Click-iT EdU Imaging Kit according to manufacturer's recommendations (Invitrogen). Immunostaining was performed following 4% paraformaldehyde fixation on paraffin sections with antibodies listed in Table S2. Standard procedures were used unless specified. Detection of apoptotic cells was carried out with the DeadEnd fluorometric TUNEL system (Promega) or using TdT-driven dig-dUTP incorporation (Promega and Rocherespectively) followed by immunolabeling and NBT/BCIP staining, according to the manufacturer's instructions. Cell nuclei were stained with Hoechst (Sigma) or DAPI (Thermo scientific).

Analysis of Cell-Cycle Parameters

For cumulative EdU incorporation assay in retinal stem cells, EdU-labeled and -unlabeled nuclei were scored among the 3 most peripheral CMZ cells on retinal sections (3 to 8 retinas analyzed per condition). The mean labeling index (LI) per retina was then plotted as a function of time after EdU injection. LI increases linearly until it reaches a plateau ($T_{plateau}$) allowing determining the growth fraction (GF; proportion of cycling cells within the considered population). The best-fit line was drawn using the Excel spreadsheet provided by Dr R. Nowakowski (Nowakowski et al., 1989). It allows estimating T_C and T_S using the two following equations : $T_{plateau} = T_C - T_S$; $LI_0 = GF \times (T_S/T_C)$ (LI_0 being the extrapolated y intercept of the best-fit line). Mitotic index and percentages of EdU-labeled mitosis were measured as previously described (Locker et al., 2006). The time required for half-maximal appearance of EdU labeling in the mitotic population was taken as an estimation of the mean G2 length (T_{G2}) (Arai et al., 2011).

***In situ* Hybridization**

Whole mount *in situ* hybridizations were carried out as previously described (Perron, 2003) and analyzed on 50µm vibratome sections. For double EdU/*Yap* mRNA staining, *in situ* hybridization was performed on cryostat section followed by EdU detection.

RNA extraction

Total RNA from 50 tadpole heads (for subsequent NanoString experiment) or 70 dissected retinas (for subsequent qPCR) was isolated using the Trizol reagent (Life Technologies) and quality assessed using the Experion automated electrophoresis system (BioRad).

Quantitative real-time PCR

Reverse transcription was performed using the iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad). qPCR reactions were performed in triplicate using SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad) on a C1000 thermalcycler (CFX96 real-time system, BioRad). Results were normalised against the expression of reference genes ODC and RPL8 using CFX Managersoftware (BioRad). PCR primer sequences are listed in Table S1.

Nanostring

The nCounter® Analysis System (Nanostring) was used according to the manufacturer's instructions to profile 16 cell cycle genes for which we designed custom CodeSets (see Table S3). The readouts represent counts of individual fluorescent barcodes and provide a sensitive measurement of the selected RNA expression levels in the sample. Background subtraction was done against 8 negative internal controls. Data were normalized with the nSolver program from NanoString, as a geometric mean, against the internal positive control spikes and afterwards against three housekeeping genes (see Table S3).

Co-immunoprecipitation assay and Western blot

Western blot were conducted using standard procedures on *Xenopus* embryo/tadpole protein extracts. Immunoprecipitation assays on HEK293T protein extracts were performed with the Dynabeads® Protein A Immunoprecipitation Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Antibodies used are listed in Table S2.

BiFC analysis

For BiFC experiments, plasmids (50 ng each) were transiently transfected in HEK293T cells using lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Cells were grown for 16hrs, fixed and immunostained using standard procedures with antibodies listed in Table S2.

Microscopy

Fluorescence and brightfield images were captured with an ApoTome-equiped AxioImager.M2 microscope and processed using AxioVision REL 7.8 software (Zeiss) or with a LSM 700 confocal microscope using ZEN software (Zeiss). Confocal pictures represent a merged z-stack of 15 slices (1 µm each).

Quantification and statistical analyses

For quantifications of labeled cells by manual cell countingin the CMZ, 6 to 10 sections per retina and a minimum of 3 retinas were analyzed. Dissected eye area, Hoechst/PCNA labeling surface or *in situ* hybridization staining intensity in the CMZ were measured using Adobe Photoshop CS4 software. All experiments were performed at least in duplicate. Shown in figures are results from one representative

experiment unless specified. In each histogram, values are given as mean ±s.e.m. Statistical analyses were performed by Student's t-test. Statistical significance is: $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; n.s. not significant.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PC contributed to most of the *Xenopus* experiments. GVL performed the *in vitro* experiments and contributed to Figure 2, 4 and S2. OB contributed to Figure 2, 4, S1, and S4. CM contributed to Figure 1 and 2. JB contributed to Figure 6. ML and RC contributed to Figure 2 and 5. MP contributed to Figure 2 and 3. KP and CB contributed to Figure 1. MH and KH contributed to Figure 5. MP, PC, OB and ML wrote the manuscript. MP and OB supervised the entire study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank S. Gee, S. Moody, P. Thiébaud and J. Smith for providing plasmids. We are grateful to J. Hamdache, E. Braginskaja, A. Ravigneaux for technical assistance and A. Chesneau, C. deMedeiros and E. Henry for animal care.We are indebted to K. Marheineke for helpful discussions and grateful to X.-J. Yang for insightful comments on the manuscript. This research was supported by grants to M.P. from the ANR, Idex Paris-Saclay, Retina France, CNRS and grants to K.H. from Cluster of Excellence and DFG Research Center Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain.

REFERENCES

Aladjem, M.I. (2007). Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. Nat. Rev. Genet. *8*, 588–600.

Aparicio, O.M. (2013). Location , location , location : it ' s all in the timing for replication origins. 117–128.

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

Attardi, L.D., and DePinho, R.A. (2004). Conquering the complexity of p53. Nat. Genet. *36*, 7–8.

Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., et al. (2014). YAP/TAZ Incorporation in the β-Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. Cell *158*, 157–170.

Barry, E.R., and Camargo, F.D. (2013). The Hippo superhighway: signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development. Curr. Opin. Cell Biol. 1–7.

Barry, E.R., Morikawa, T., Butler, B.L., Shrestha, K., de la Rosa, R., Yan, K.S., Fuchs, C.S., Magness, S.T., Smits, R., Ogino, S., et al. (2013). Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. Nature *493*, 106–110.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. FEBS Lett. *490*, 117–122.

Berthelsen, J., Zappavigna, V., Mavilio, F., and Blasi, F. (1998). Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. EMBO J. *17*, 1423–1433.

Burgess, R.J., Agathocleous, M., and Morrison, S.J. (2014). Metabolic regulation of stem cell function. J. Intern. Med. *276*, 12–24.

Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R.F., Maitra, A., and Pan, D. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. Genes Dev. *24*, 2383–2388.

Cai, L., Hayes, N.L., and Nowakowski, R.S. (1997). Synchrony of clonal cell proliferation and contiguity of clonally related cells: production of mosaicism in the ventricular zone of developing mouse neocortex. J. Neurosci. *17*, 2088–2100.

Cao, X., Pfaff, S.L., and Gage, F.H. (2008). YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. Genes Dev. *22*, 3320–3334.

Centanin, L., Hoeckendorf, B., and Wittbrodt, J. (2011). Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. Cell Stem Cell *9*, 553–562.

Chen, Q., Zhang, N., Gray, R.S., Li, H., Ewald, A.J., Zahnow, C.A., and Pan, D. (2014). A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. Genes Dev. *28*, 432–437.

Daniels, M., Dhokia, V., Richard-Parpaillon, L., and Ohnuma, S.-I. (2004). Identification of Xenopus cyclin-dependent kinase inhibitors, p16Xic2 and p17Xic3. Gene *342*, 41–47.

Deflorian, G., Tiso, N., Ferretti, E., Meyer, D., Blasi, F., Bortolussi, M., and Argenton, F. (2004). Prep1.1 has essential genetic functions in hindbrain development and cranial neural crest cell differentiation. Development *131*, 613–627.

Van Dierendonck, J.H., Keyzer, R., van de Velde, C.J., and Cornelisse, C.J. (1989). Subdivision of S-phase by analysis of nuclear 5-bromodeoxyuridine staining patterns. Cytometry *10*, 143–150.

Dominguez-Sola, D., Ying, C.Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., Galloway, D.A., Gu, W., Gautier, J., and Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. Nature *448*, 445–451.

Donley, N., and Thayer, M.J. (2013). DNA replication timing, genome stability and cancer: late and/or delayed DNA replication timing is associated with increased genomic instability. Semin. Cancer Biol. *23*, 80–89.

Fernandez-Diaz, L.C., Laurent, A., Girasoli, S., Turco, M., Longobardi, E., Iotti, G., Jenkins, N. a, Fiorenza, M.T., Copeland, N.G., and Blasi, F. (2010). The absence of Prep1 causes p53-dependent apoptosis of mouse pluripotent epiblast cells. Development *137*, 3393–3403.

Ferretti, E., Villaescusa, J.C., Rosa, P. Di, Fernandez-diaz, L.C., Longobardi, E., Miccio, A., Micali, N., Selleri, L., Ferrari, G., Blasi, F., et al. (2006). Hypomorphic Mutation of the TALE Gene Prep1 (pKnox1) Causes a Major Reduction of Pbx and Meis Proteins and a Pleiotropic Embryonic Phenotype Hypomorphic Mutation of the TALE Gene Prep1 (pKnox1) Causes a Major Reduction of Pbx and Meis Proteins and a P. *1*.

Gee, S.T., Milgram, S.L., Kramer, K.L., Conlon, F.L., and Moody, S. a (2011). Yes-associated protein 65 (YAP) expands neural progenitors and regulates Pax3 expression in the neural plate border zone. PLoS One *6*, e20309.

Insinga, A., Cicalese, A., and Pelicci, P.G. (2014). DNA damage response in adult stem cells. Blood Cells. Mol. Dis. *52*, 147–151.

Iotti, G., Longobardi, E., Masella, S., Dardaei, L., De Santis, F., Micali, N., and Blasi, F. (2011a). Homeodomain transcription factor and tumor suppressor Prep1 is required to maintain genomic stability. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, E314.

Iotti, G., Longobardi, E., Masella, S., Dardaei, L., De Santis, F., Micali, N., and Blasi, F. (2011b). Homeodomain transcription factor and tumor suppressor Prep1 is required to maintain genomic stability. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, E314–22.

Jansson, L., and Larsson, J. (2012). Normal hematopoietic stem cell function in mice with enforced expression of the Hippo signaling effector YAP1. PLoS One *7*, e32013.

Kanekar, S., Perron, M., Dorsky, R., Harris, W.A., Jan, L.Y., Jan, Y.N., and Vetter, M.L. (1997). Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing Xenopus retina. Neuron *19*, 981–994.

Koberna, K., Ligasová, A., Malínský, J., Pliss, A., Siegel, A.J., Cvacková, Z., Fidlerová, H., Masata, M., Fialová, M., Raska, I., et al. (2005). Electron microscopy of DNA replication in 3-D: evidence for similar-sized replication foci throughout S-phase. J. Cell. Biochem. *94*, 126–138.

Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., Chinnaiyan, A., Israel, M. a, Goldstein, L.S.B., Abujarour, R., et al. (2010). The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. Genes Dev. *24*, 1106–1118.

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

Micali, N., Ferrai, C., Fernandez-Diaz, L.C., Blasi, F., and Crippa, M.P. (2009). Prep1 directly regulates the intrinsic apoptotic pathway by controlling Bcl-XL levels. Mol. Cell. Biol. *29*, 1143–1151.

Naye, F., Tréguer, K., Soulet, F., Faucheux, C., Fédou, S., Thézé, N., and Thiébaud, P. (2007). Differential expression of two TEF-1 (TEAD) genes during Xenopus laevis development and in response to inducing factors. Int. J. Dev. Biol. *51*, 745–752.

Neto-Silva, R.M., de Beco, S., and Johnston, L. a (2010). Evidence for a growth-stabilizing regulatory feedback mechanism between Myc and Yorkie, the Drosophila homolog of Yap. Dev. Cell *19*, 507–520.

Nowakowski, R.S., Lewin, S.B., and Miller, M.W. (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. J. Neurocytol. *18*, 311–318.

Ohashi, K., and Mizuno, K. (2014). A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. Methods Mol. Biol. *1174*, 247–262.

Pefani, D.-E., Latusek, R., Pires, I., Grawenda, A.M., Yee, K.S., Hamilton, G., van der Weyden, L., Esashi, F., Hammond, E.M., and O'Neill, E. (2014). RASSF1A-LATS1 signalling stabilizes replication forks by restricting CDK2-mediated phosphorylation of BRCA2. Nat. Cell Biol. *16*, 962–971.

Peng, H.W., Slattery, M., and Mann, R.S. (2009). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the Drosophila eye imaginal disc. Genes Dev. *23*, 2307–2319.

Perron, M. (2003). A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. Development *130*, 1565–1577.

Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M.L., and Harris, W.A. (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the Xenopus eye. Dev. Biol. *199*, 185–200.

Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. Physiol. Rev. *94*, 1287–1312.

Quastler, H., and Sherman, F.G. (1959). Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. Exp. Cell Res. *17*, 420–438.

Ramos, A., and Camargo, F.D. (2012). The Hippo signaling pathway and stem cell biology. Trends Cell Biol. 1–8.

Robinson, K., Asawachaicharn, N., Galloway, D.A., and Grandori, C. (2009). c-Myc accelerates S-phase and requires WRN to avoid replication stress. PLoS One *4*, e5951.

Saka, Y., Hagemann, A.I., and Smith, J.C. (2008). Visualizing protein interactions by bimolecular fluorescence complementation in Xenopus. Methods *45*, 192–195.

Srinivasan, S. V, Dominguez-Sola, D., Wang, L.C., Hyrien, O., and Gautier, J. (2013). Cdc45 is a critical effector of myc-dependent DNA replication stress. Cell Rep. *3*, 1629–1639.

Stocker, H. (2011). Growth control: Myc and Yorkie get connected. Curr. Biol. *21*, R37–9.

Tallafuss, a., Gibson, D., Morcos, P., Li, Y., Seredick, S., Eisen, J., and Washbourne, P. (2012). Turning gene function ON and OFF using sense and antisense photo-morpholinos in zebrafish. Development *139*, 1691–1699.

Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. Nature *408*, 307–310.

Watanabe, Y., and Maekawa, M. (2010). Spatiotemporal regulation of DNA replication in the human genome and its association with genomic instability and disease. Curr. Med. Chem. *17*, 222–233.

Wetts, R., Serbedzija, G.N., and Fraser, S.E. (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. Dev. Biol. *136*, 254–263.

Xiao, W., Wang, J., Ou, C., Zhang, Y., Ma, L., Weng, W., Pan, Q., and Sun, F. (2013). Mutual interaction between YAP and c-Myc is critical for carcinogenesis in liver cancer. Biochem. Biophys. Res. Commun. *439*, 167–172.

Xue, X.Y., and Harris, W. a (2011). Using myc genes to search for stem cells in the ciliary margin of the Xenopus retina. Dev. Neurobiol.

El Yakoubi, W., Borday, C., Hamdache, J., Parain, K., Tran, H.T., Vleminckx, K., Perron, M., and Locker, M. (2012). Hes4 controls proliferative properties of neural stem cells during retinal ontogenesis. Stem Cells *30*, 2784–2795.

Yamazaki, S., Hayano, M., and Masai, H. (2013). Replication timing regulation of eukaryotic replicons: Rif1 as a global regulator of replication timing. Trends Genet. *29*, 449–460.

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. Nat. Cell Biol. *16*, 2–9.

Zhang, H., Deo, M., Thompson, R.C., Uhler, M.D., and Turner, D.L. (2012). Negative regulation of Yap during neuronal differentiation. Dev. Biol. *361*, 103–115.

Zhang, T., Zhou, Q., and Pignoni, F. (2011). Yki/YAP, Sd/TEAD and Hth/MEIS control tissue specification in the Drosophila eye disc epithelium. PLoS One *6*, e22278.

Zhang, W., Nandakumar, N., Shi, Y., Manzano, M., Smith, A., Graham, G., Gupta, S., Vietsch, E.E., Laughlin, S.Z., Wadhwa, M., et al. (2014). Downstream of mutant KRAS, the transcription regulator YAP is essential for neoplastic progression to pancreatic ductal adenocarcinoma. Sci. Signal. *7*, ra42.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. Genes Dev. *21*, 2747–2761.

Zhao, R., Fallon, T.R., Saladi, S.V., Pardo-Saganta, A., Villoria, J., Mou, H., Vinarsky, V., Gonzalez-Celeiro, M., Nunna, N., Hariri, L.P., et al. (2014). Yap Tunes Airway Epithelial Size and Architecture by Regulating the Identity, Maintenance, and Self-Renewal of Stem Cells. Dev. Cell *30*, 151–165.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: *Yap* overexpression results in the expansion of the proliferating cell population in the post-embryonic retina.

(A) Schematic of a transverse *Xenopus* tadpole retina showing the CMZ in the peripheral region (RPE: retinal pigment epithelium; NR: neural retina; ON: optic nerve). Within the CMZ (right panel), retinal stem cells (RSC) reside in the most peripheral margin while actively dividing progenitors (P1) and their post-mitotic progeny (P2) are localized more centrally. (**B**) *In situ* hybridization analysis of *Yap* expression (arrows) on stage 40 retinal sections. (**C**) Immunostaining analysis with anti-YAP antibody at stage 42 retinal sections. YAP labeling is detected both in CMZ and Müller glial cells (arrows). Images on the right show higher magnifications of the CMZ. **(D)** EdU labeling (3-hours pulse) and *Yap in situ* hybridization (dotted line) on stage 40 retinas. (**E**) Lateral views (left panels), head dorsal views (middle panels) and dissected eyes (right panels) of stage 40 tadpoles following two-cell stage microinjection of *GFP* mRNA as a lineage tracer with either *β-gal* (control) or *Yap* mRNA. An asterisk indicates the injected side. Arrows point to morphological defects in the abdomen, brain and eyes. (**F**) Quantification of the area of dissected eyes. (**G-J**) TUNEL (**G-H**) or EdU incorporation (3-hour pulse, **I-J**) assays performed on tadpoles injected as in (**E**) and analyzed on retinal sections at stage 33/34 and stage 40, respectively. Arrows point to TUNEL positive cells in higher magnifications of the area delineated with dotted line (**G**). For all quantifications the number of analyzed tadpoles is indicated in each bar and data are represented as mean +/- SEM. Scale bar = 1mm in E and 40µm in other panels.**$p<0.01$, ***$p<0.001$ (Student's *t*-test).

Figure 2: *Yap* loss of function decreases eye size and EdU incorporation in the post-embryonic retina.

(A) Lateral views (left panels), head dorsal views (middle panels) and dissected eyes (right panels) of stage 40 tadpoles following two-cell stage microinjection of *Yap* 5-mismatch MO (control) or *Yap*-MO. The asterisk indicates the injected side. **(B)** Quantification of the dissected eye area. The quantification is also given for eyes of tadpoles injected with *Yap*-AS-photo-MO or *Yap*-S-photo-MO+*Yap*-MO allowing for conditional inducible or reversible *Yap* knockdown (see also Figure S2 for details and controls of this experiment). (**C**) Eyes of stage 40 tadpoles following optic vesicle transplantation at stage 25 as shown in the schematic. Dotted lines delineate the eye circumference. (**D**) EdU incorporation (6-hour pulse) assay performed on tadpoles microinjected as in (A) and analyzed on retinal sections at stage 40. Higher magnifications of the CMZ delineated by dotted lines

are shown. (**F**) The number of EdU positive cells was quantified within the whole CMZ and within the 3 stem cells at the tip of the CMZ. (**G-K**) *In situ* hybridization analyses of *Hes4* (El Yakoubi et al., 2012) and *Atoh7* (Kanekar et al., 1997) (G), Hoechst staining (H-I) and PCNA immunolabeling (J-K) on stage 40 retinal sections of tadpoles injected as in (A). The CMZ delineated in (G) with dotted lines is enlarged in the panels on the right. For all quantifications, the number of analyzed retinas per condition is indicated in each bar and data are represented as mean +/- SEM. ***p<0.001, **p<0.01 (Student's *t*-test). Scale bar = 1mm in A and 40µm in other panels.

Figure 3: *Yap* loss of function affects cell cycle kinetics of retinal stem cells.

(A) PH3 immunolabeling on retinal section of stage 40 tadpoles following two-cell stage microinjection of *Yap* 5-mismatch MO (control) or a *Yap*-MO. The CMZ is delineated with dotted lines. (**B**) Quantification of the number of mitotic cells within the CMZ. The number of analyzed retinas per condition is indicated in each bar. Data are represented as mean +/- SEM. **(C)** PLM and CLM experimental outline: tadpoles injected with MO as in (A) were fixed at different times as indicated following EdU injection at stage 39. EdU and PH3 labeling were analyzed on retinal sections. **(D)** PLM illustration showing typical CMZ (delineated with dotted lines) at stage 39 stained for both PH3 and EdU. Arrows point to double labeled cells while arrowheads point to $PH3^{+}Edu^{-}$ cells. (**E**) Quantification of the PLM within the whole CMZ after cumulative EdU labeling within a period of 10 hours. T_{G2}: G2 phase duration. **(F)** Cumulative EdU-labeling within retinal stem cells.T_C: total cell cycle; T_S: S phase. **(G)** Estimation of T_C and T_S. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 (Student's *t*-test). Scale bar = 40µm.

Figure 4: *Yap* loss of function affects the temporal program of retinal stem cell DNA replication.

(A) *In situ* hybridization analysis of *c-Myc* expression on stage 40 retina following two-cell stage microinjection of *Yap* 5-mismatch MO (control) or *Yap*-MO. Images on the right show higher magnifications of the CMZ. Note the strong expansion of the *c-Myc* expression area (bracket). (**B**) Quantification of the staining intensity in the CMZ. The number of analyzed retinal sections per condition is indicated in each bar. **(C)** qPCR analysis of retinal *c-Myc* expression in tadpoles injected with MO as in (A). **(D)** Schema of different expected replication patterns during S-phase progression, as inferred from EdU labeling. Pictures illustrate two examples of EdU patterns observed in control CMZ cells, one homogenous and one with large dots. **(E)** DNA replication patterns analysis using EdU staining (1 hour-pulse) following *Yap* 5-mismatch MO (control) or *Yap*-MO injection. Enlargements of the tip of the CMZ (dotted lines) are shown on the right. Early (red arrows) and

mid/late profiles (white arrows) were distinguished. **(F)** Quantification of the early/late replication patterns number. The number of analyzed retinas per condition is indicated in each bar. Data are represented as mean +/- SEM. **p<0.01***p<0.001 (Student's *t*-test). Scale bar = 40µm.

Figure 5: *Yap* loss of function induces DNA damage.

(A) γ-H2AX immunolabeling on CMZ section of stage 40 tadpoles following two-cell stage microinjection of either *Yap* 5-mismatch MO (control) or *Yap*-MO. Arrows point to γ-H2AX positive cells. **(B)** Quantification of the number of γ-H2AX positive cells per section. **(C)** TUNEL assay performed on retinal sections of stage 40 tadpoles injected as in (A). Images on the right show higher magnifications of the CMZ delineated with dotted lines. **(D)** Quantification of the number of TUNEL positive cells in different areas of the CMZ illustrated in the schematic on the right. **(E)** EdU pulse-chase assay at stage 42 following *Yap*-MO injection and 2 days of chase. EdU positive cells in the neural layers of the central retina are encircled with reddotted lines.The CMZ is delineated with white dotted lines. GCL: ganglion cell layer; INL: Inner nuclear layer; ONL: outer nuclear layer. **(F)** Quantification of the number of EdU positive cells in the layers of the neural retina. **(G)** Expression of cell cycle genes as measured by the NanoString nCounter system from head RNAs of stage 40 tadpoles following two-cell stage microinjection of either Standard MO (control) or *Yap*-MO. Data are the mean of four independent experiments. **(H)** *In situ* hybridization analyses of *p53* and *p21* expression on retinal sections of stage 40 tadpoles injected as in (A). In A, D and F, the number of analyzed retinas per condition is indicated in each bar. Data are represented as mean +/- SEM. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 (Student's *t*-test). Scale bar = 40µm.

Figure 6: Physical interaction between YAP and PKNOX1.

(A) Schematic representation of the BiFC analyses. **(B)** Immunolabeling on HEK293T cells transfected with VN and VC chimeric constructs, as indicated. **(C)** Co-immunoprecipitation assay of 293T cells transfected with tagged constructs as indicated. Scale bars = 20 µm.

Figure 7: Functional interaction between YAP and PKNOX1.

(A) *In situ* hybridization analysis of *pknox1* expression (arrows) on stage 40 retinal sections. Enlargement of the CMZ region delineated with dotted lines is shown on the right panel. **(B)** Lateral views (left panels), head dorsal views (middle panels) and dissected eyes (right panels) of stage 40

tadpoles following two-cell stage microinjection of *pknox1* 5-mismatch MO (control) or *pknox1*-MO. The asterisk indicates the injected side. **(C)** Quantification of the dissected eye area. **(D-I)** EdU labeling on retinal sections following a 3-hours pulse EdU and quantification of the number of EdU positive cells in the CMZ of stage 40 tadpoles microinjected with *pknox1* 5-mismatch MO (control) or *pknox1*-MO (**D,E**); GFP mRNA and either ß-gal mRNA (control), *Yap* + ß-gal mRNA (Yap), *pknox1* + ß-gal mRNA (*pknox1*), *Yap* + *pknox1* mRNA (*Yap* + *pknox1*) (**F,G**); *pknox1* 5-mismatch MO + ß-gal mRNA (control), *pknox1*-MO + ß-gal mRNA (*pknox1*-MO),*pknox1* 5-mismatch MO + *Yap* mRNA (*Yap*), *pknox1*-MO and *Yap* mRNA (*Yap*+*pknox*-MO) (**H,I**). The total number of analyzed retinas per condition is indicated in each bar. Data are represented as mean +/- SEM. ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05 (Student's *t*-test). Scale bar = 1mm in (A) and 40µm for all other panels.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental figure 1: Validation of *Yap*-MO efficiency and specificity.

(A) Immunostaining analysis with anti-YAP antibody retinal sections of stage 42 tadpoles following microinjection of either *Yap* 5-mismatch MO (control) or *Yap*-MO. YAP is undetectable in *Yap* morphants. **(B)** Western blot showing the reduction in YAP expression at different stages following microinjection as in (A). α-tubulin is used as a loading control. **(C)** Lateral views and dissected eyes of stage 40 tadpoles following two-cell stage microinjection of *Yap* 5-mismatch MO + ß-gal mRNA (control), *Yap*-MO + ß-gal mRNA (*Yap*-MO), *Yap* 5-mismatch MO + *Yap* mRNA (*Yap*), *Yap*-MO + *Yap* mRNA (*Yap*-MO + *Yap*). **(D)** Quantification of the dissected eye area. The phenotype of smaller eye can be rescued by co-injecting *Yap*-MO with *Yap* mRNA. The number of analyzed tadpoles is indicated for each bar. Data are represented as mean +/- SEM. *p<0.05 (Student's *t*-test). Scale bar = 40µm in (A) and 1mm in (B).

Supplemental figure 2: Conditional *Yap* knockdown in the retina.

(A) Principle of reversible and inducible gene knockdown technology using photo-Morpholinos (photo-MO). Photo-MO contains a photo-sensitive subunit cleaved by 365 nm light. *Yap*-AS-photo-MO translation blocking activity is interrupted upon UV light exposure. Unmodified *Yap*-MO are rendered inactive by binding to *Yap*-S-photo-MO. The target RNA thus maintains normal expression until the antisense MO are released by light-induced cleavage of the sense MO. **(B)** Diagram of the experimental design. Embryos are microinjected with MO at the two-cell stage, then subjected to UV

exposure at different stages of development as indicated (black flashes, conditions *iv*, *v* and *vi*) and allowed to develop to stage 40 for analyses. **(C)** Lateral views and dissected eyes of stage 40 tadpoles following two-cell stage microinjections with the indicated MO (see table in B). We verified that UV light exposure, under the experimental conditions used, does not generate significant effects on eye size (data not shown). Tadpoles injected with *Yap*-MO or *Yap*-AS-photo-MO, without UV treatment (*ii* and *iii*) exhibited a similar reduction of the eye size compared to controls (*i*). Tadpoles exposed to UV light right after injection (*iv*) have a wild type phenotype, demonstrating the efficiency of *Yap*-AS-photo-MO cleavage. Restoring *Yap* function from stage 33/34 (*v*), or even from stage 37/38 (*vi*) onwards is sufficient to maintain wild type eye growth, demonstrating that *Yap* knockdown during embryonic development only is not sufficient to lead to a reduced eye size phenotype. **(D)** Quantification of the dissected eye area. **(E)** Tadpoles co-injected with *Yap*-S-photo-MO and *Yap*-MO without UV treatment (*iii'*) exhibited normal eye size, similar to the control (*i'*) showing effective blockade of the antisense *Yap*-MO. Light exposure immediately after the injection (*iv'*) leads, as with *Yap*-MO (*ii'*), to tadpoles exhibiting a smaller eye, demonstrating the efficiency of *Yap*-S-photo-MO cleavage. Conditional induction of *Yap* loss function by light exposure at stage 33/34 (*v'*) or even at stage 37/38 (*vi'*) is sufficient to result in a small eye phenotype, suggesting that *Yap* is required at post-embryonic stages to maintain CMZ-dependent eye growth. **(F)** Quantification of the dissected eye area. The number of analyzed tadpoles is indicated in each bar. Data are represented as mean +/- SEM. ***p<0.001 (Student's *t*-test). Scale bar = 1mm.

Supplemental figure 3: *Yap* inducible knockdown reduces EdU incorporation in post-embryonic retina.

(A) EdU labeling on retinal sections following an incorporation assay (3-hours pulse) performed at stage 41 tadpole microinjected at two-cell stagewith *Yap* 5-mismatch MO (control), *Yap*-MO and/or *Yap*-S-photo-MO, as indicated in the table. **(B)** Quantification of the number of EdU positive cells within the CMZ per section. The total number of analyzed retinas per condition is indicated in each bar. Data are represented as mean +/- SEM. **p<0.01, ***p<0.001 (Student's *t*-test). Scale bar = 40µm.

Supplemental figure 4: Validation of *pknox1*-MO efficiency and specificity.

(A) Schematic representation of the chimeric construct containing *GFP* fused downstream of *pknox1*-MO complementary sequence (*pknox1*(5')-*GFP*). **(B)** GFP fluorescence analyzes at stage 20 following co-microinjection of*GFP* mRNA + *pknox1* 5-mismatch MO (control), *GFP* mRNA + *pknox1*-MO

(*pknox1*-MO), *pknox1*(5')-*GFP*+ *pknox1* 5-mismatch MO (*pknox1*(5')-GFP), *pknox1*(5')-*GFP* + *pknox1*-MO. Fluorescence imaging at 594 nm detected the lissamine tag on MO. *pknox1*-MO inhibits GFP translation from *pknox1*(5')-*GFP* construct. **(C)** Lateral views and dissected eyes of stage 40 tadpoles following two-cell stage microinjection of *pknox1* 5-mismatch MO + ß-gal mRNA (control), *pknox1*-MO + ß-gal mRNA (*pknox1*-MO), *pknox1* 5-mismatch MO + *pknox1* mRNA (*pknox1*), *pknox1*-MO + *pknox1* mRNA (*pknox1*-MO + *pknox1*). **(D)** Quantification of the dissected eye area. The phenotype of smaller eye can be rescued by co-injection with *pknox1* mRNA.The number of analyzed tadpoles is indicated for each bar. Data are represented as mean +/- SEM. **$p<0.01$ (Student's *t*-test). Scale bar = 1mm.

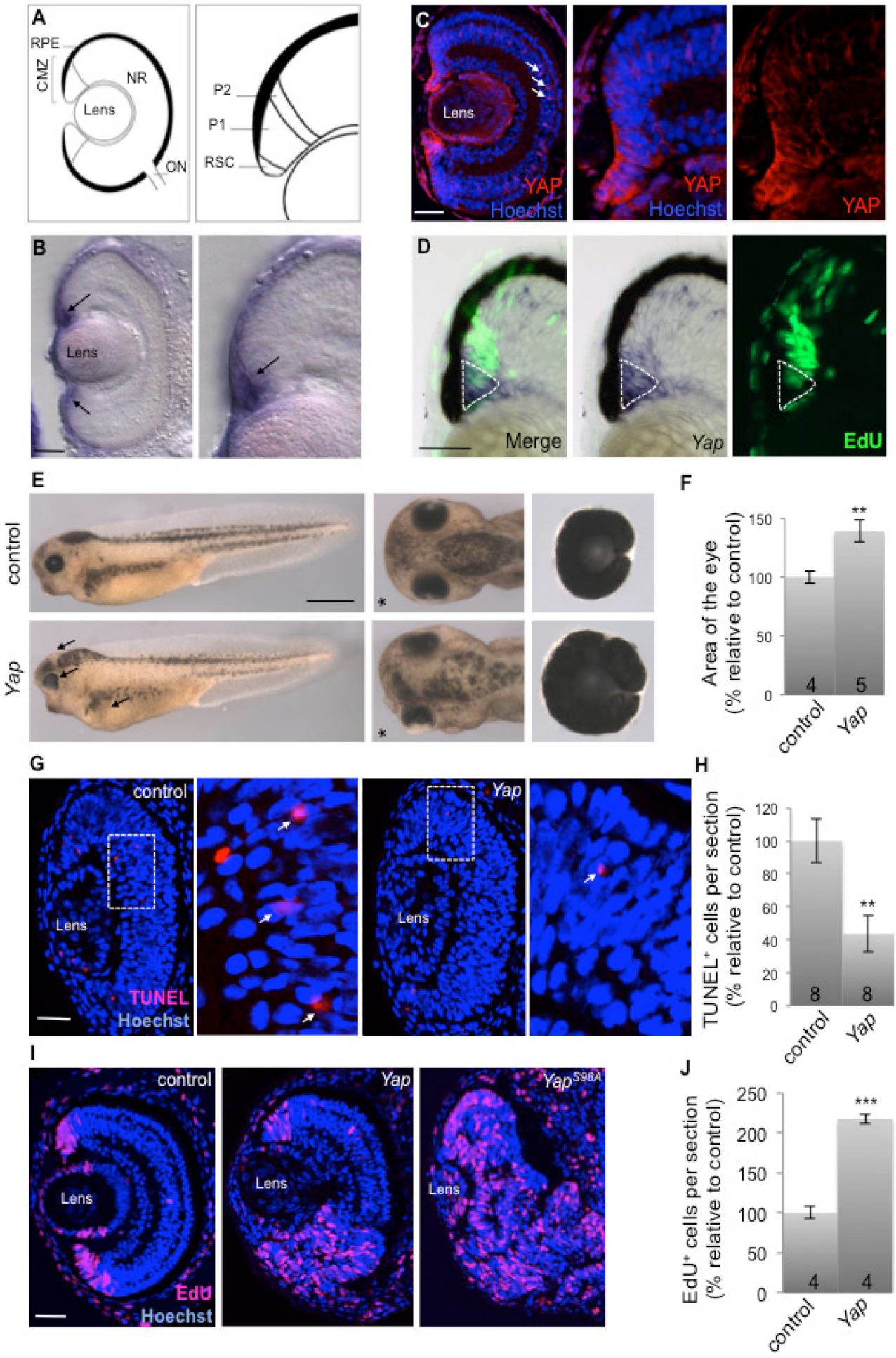

A
RPE
CMZ
NR
Lens
ON
P2
P1
RSC
C
Lens
YAP
Hoechst
YAP
Hoechst
YAP
B
Lens
D
Merge
Yap
EdU
E
control
Yap
F
Area of the eye
(% relative to control)
150
100
50
0
4
5
control
Yap
G
control
Lens
TUNEL
Hoechst
Yap
Lens
H
TUNEL+ cells per section
(% relative to control)
120
100
80
60
40
20
0
8
8
control
Yap
I
control
Lens
EdU
Hoechst
Yap
Lens
YapS98A
Lens
J
EdU+ cells per section
(% relative to control)
250
200
150
100
50
0
4
4
control
Yap

Figure 1

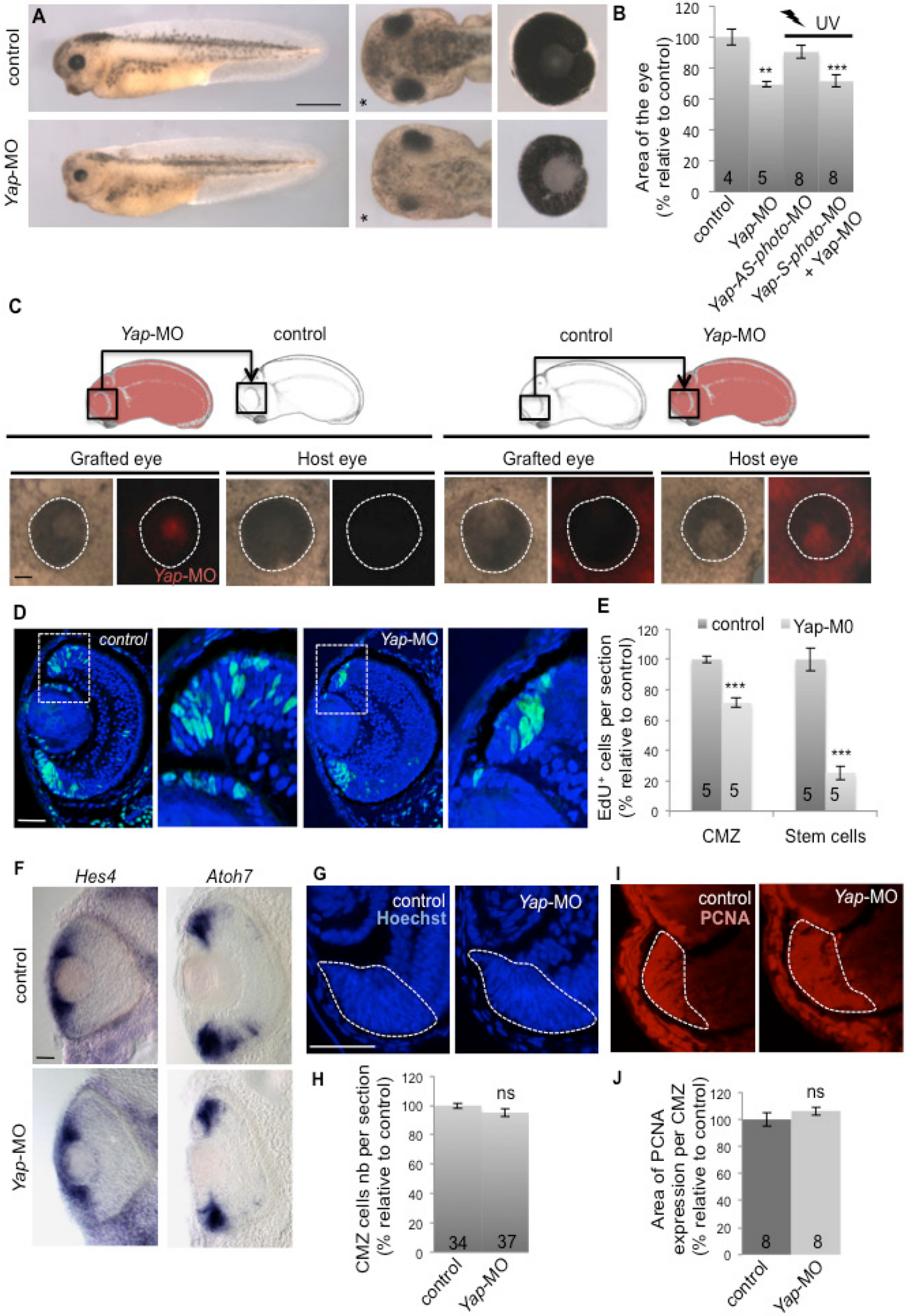
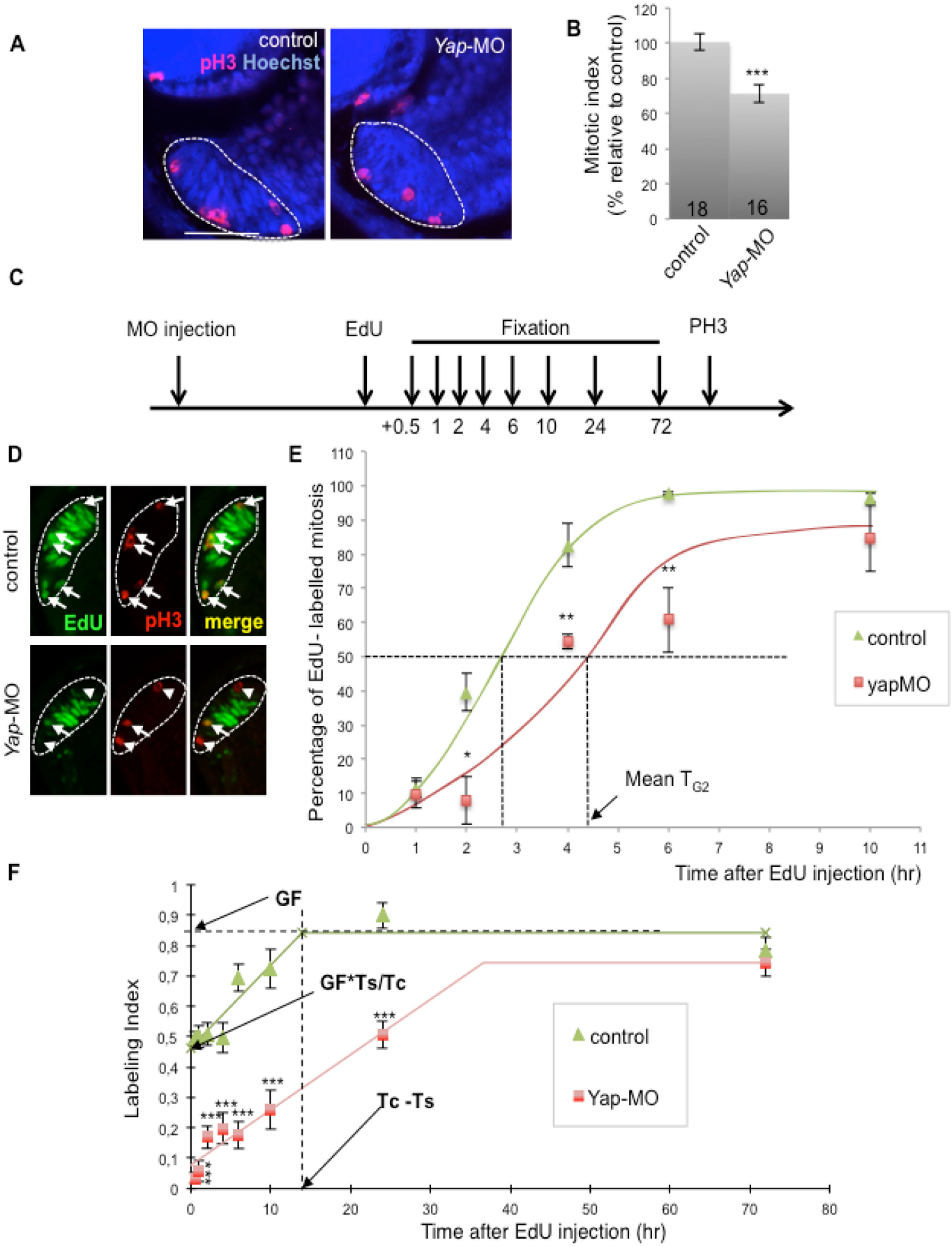

A
control
Yap-MO
B
UV
Area of the eye
(% relative to control)
120
100
80
60
40
20
0
**
***
4
5
8
8
control
Yap-MO
Yap-AS-photo-MO
Yap-S-photo-MO
+ Yap-MO
C
Yap-MO
control
control
Yap-MO
Grafted eye
Host eye
Grafted eye
Host eye
Yap-MO
D
control
Yap-MO
E
control
Yap-M0
EdU+ cells per section
(% relative to control)
***
***
5
5
5
5
CMZ
Stem cells
F
Hes4
Atoh7
control
Yap-MO
G
control
Hoechst
Yap-MO
I
control
PCNA
Yap-MO
H
CMZ cells nb per section
(% relative to control)
ns
34
37
control
Yap-MO
J
Area of PCNA
expression per CMZ
(% relative to control)
ns
8
8
control
Yap-MO

Figure 2



G

	control	*Yap*-MO
Ts (hr)	17.2	4.2
Tc (hr)	31.1	40.9

Figure 3

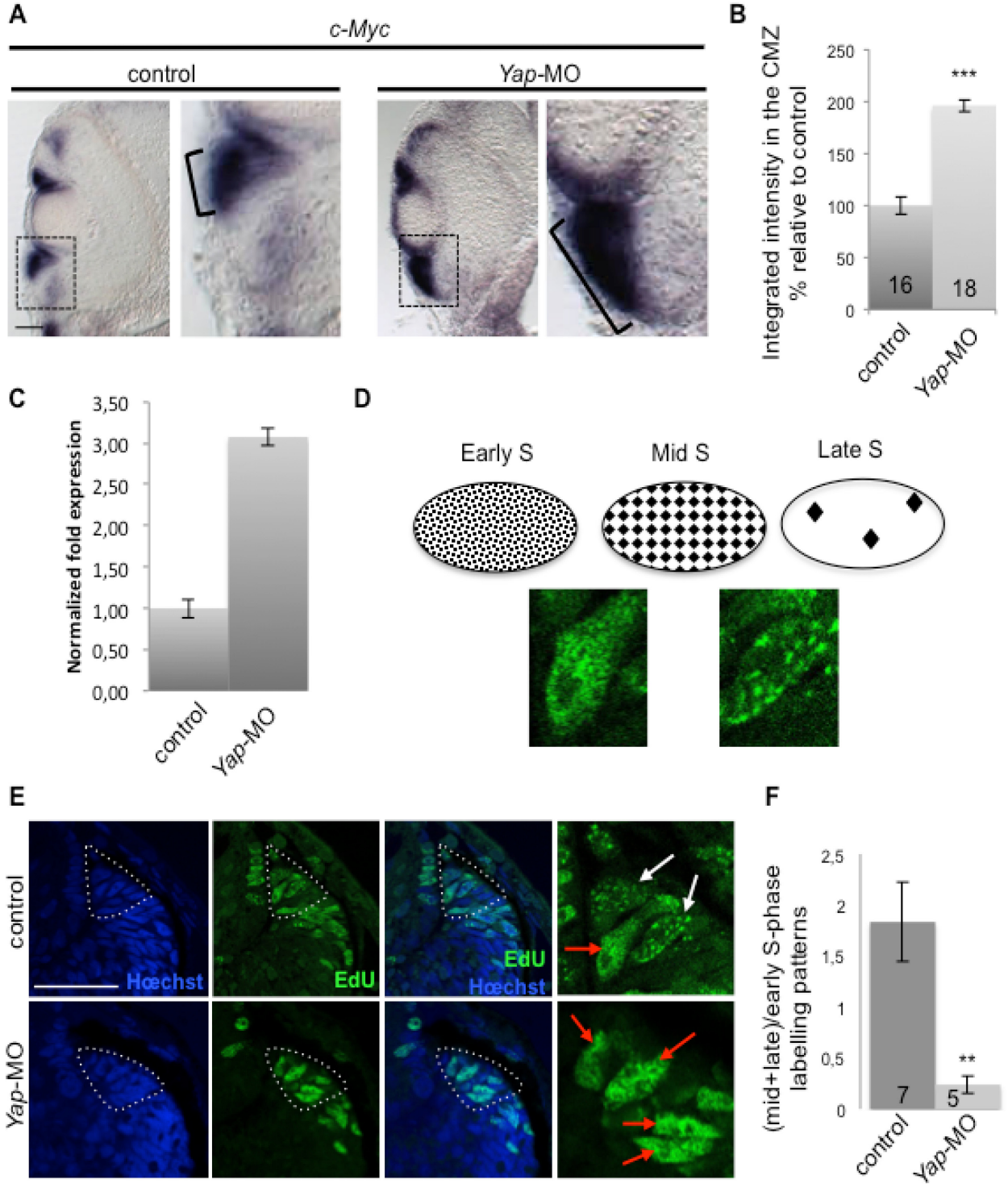

A
c-Myc
control
Yap-MO
B
Integrated intensity in the CMZ
% relative to control
250
200
150
100
50
0
***
16
18
control
Yap-MO
C
Normalized fold expression
3,50
3,00
2,50
2,00
1,50
1,00
0,50
0,00
control
Yap-MO
D
Early S
Mid S
Late S
E
control
Yap-MO
Hœchst
EdU
EdU
Hœchst
F
(mid+late)/early S-phase
labelling patterns
2,5
2
1,5
1
0,5
0
**
7
5
control
Yap-MO

Figure 4

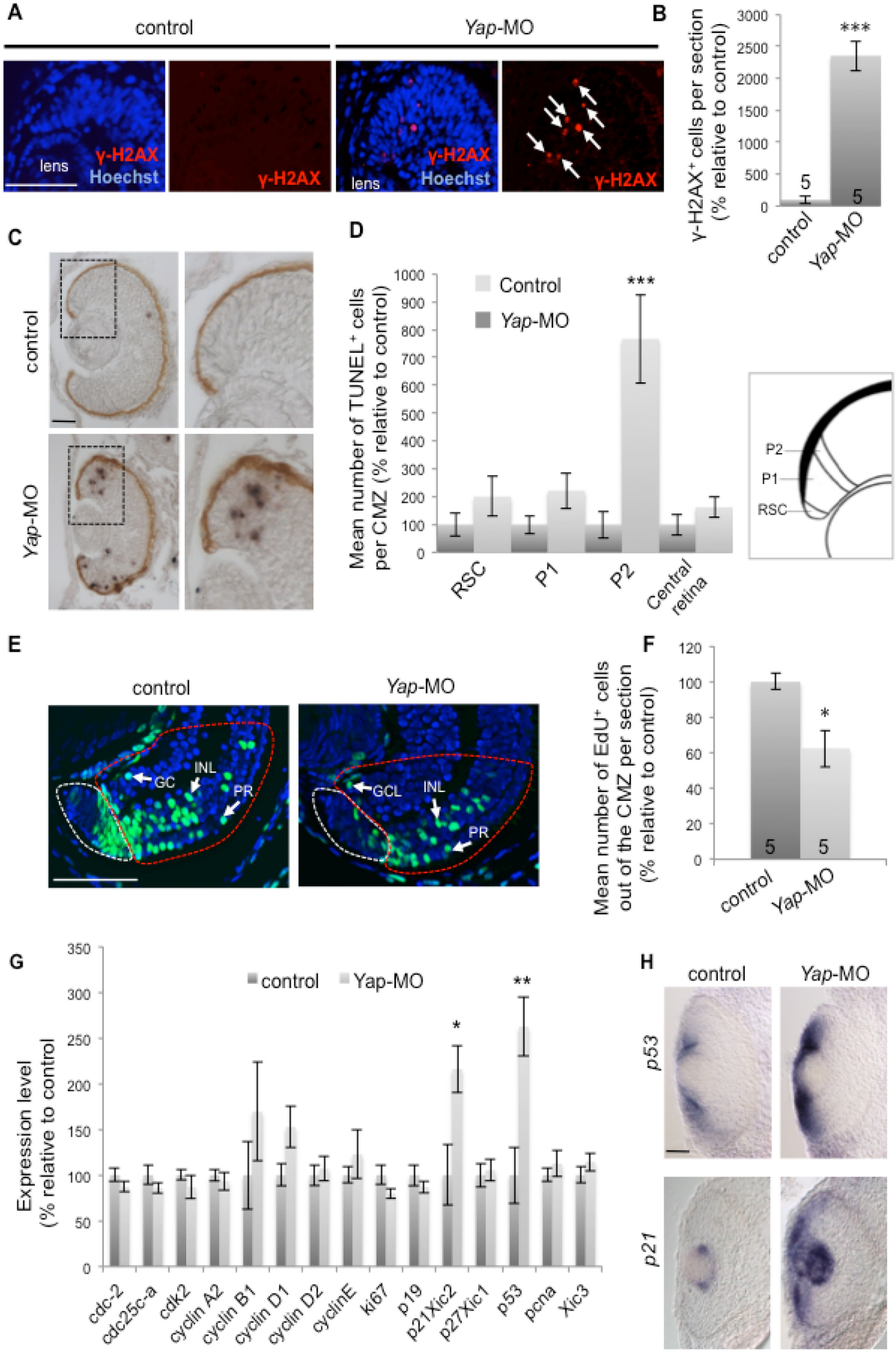

A
control
Yap-MO
lens
γ-H2AX
Hoechst
γ-H2AX
lens
γ-H2AX
Hoechst
γ-H2AX
B
γ-H2AX+ cells per section (% relative to control)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
***
5
5
control
Yap-MO
C
control
Yap-MO
D
Mean number of TUNEL+ cells per CMZ (% relative to control)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
Control
Yap-MO
***
RSC
P1
P2
Central retina
P2
P1
RSC
E
control
Yap-MO
GC
INL
PR
GCL
INL
PR
F
Mean number of EdU+ cells out of the CMZ per section (% relative to control)
120
100
80
60
40
20
0
*
5
5
control
Yap-MO
G
Expression level (% relative to control)
350
300
250
200
150
100
50
0
control
Yap-MO
*
**
cdc-2
cdc25c-a
cdk2
cyclin A2
cyclin B1
cyclin D1
cyclin D2
cyclinE
ki67
p19
p21Xic2
p27Xic1
p53
pcna
Xic3
H
control
Yap-MO
p53
p21

Figure 5

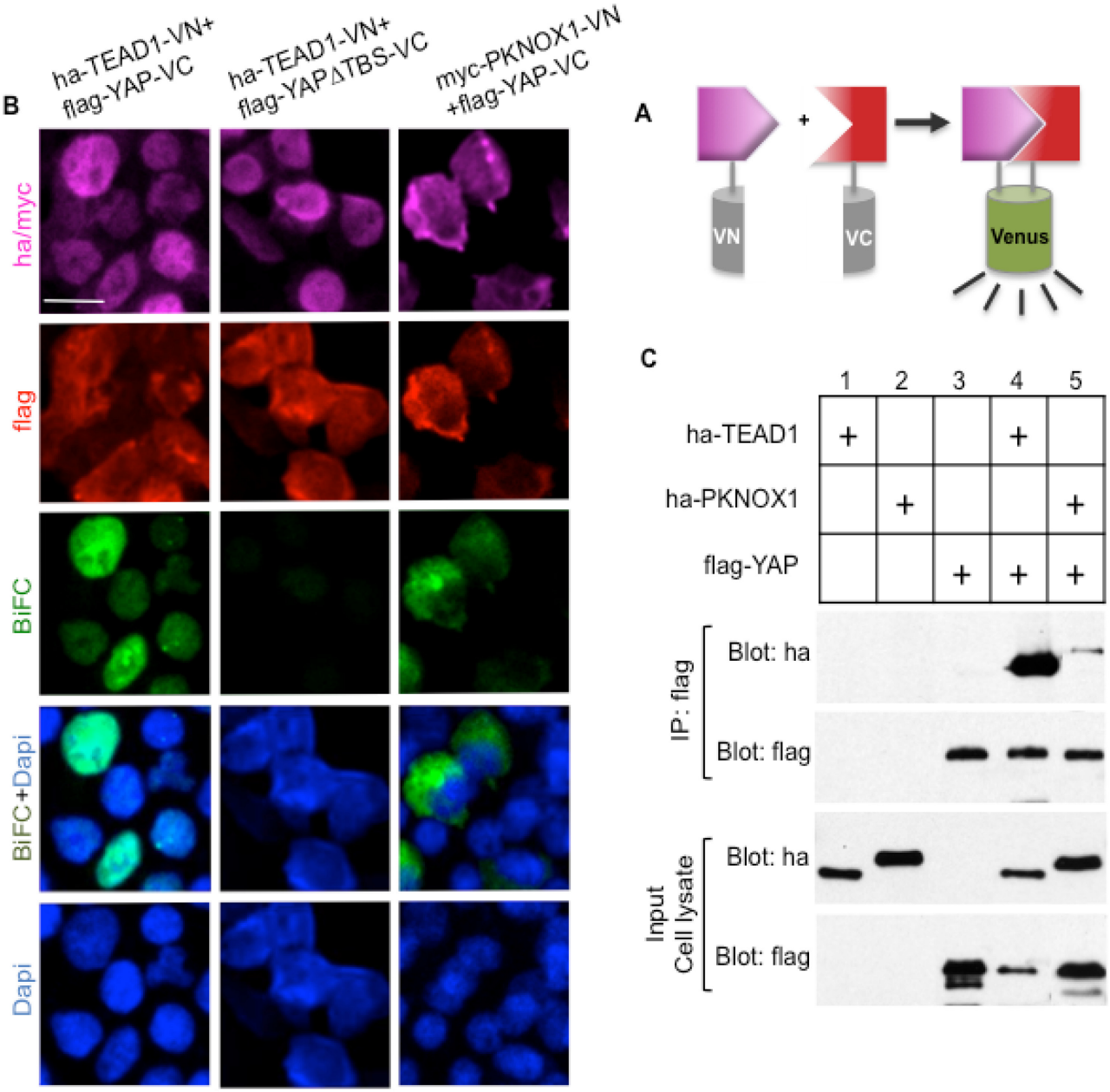

B
ha-TEAD1-VN+
flag-YAP-VC
ha-TEAD1-VN+
flag-YAPΔTBS-VC
myc-PKNOX1-VN
+flag-YAP-VC
ha/myc
flag
BiFC
BiFC+Dapi
Dapi
A
VN
VC
Venus
C
1 2 3 4 5
ha-TEAD1
ha-PKNOX1
flag-YAP
IP: flag
Blot: ha
Blot: flag
Input
Cell lysate
Blot: ha
Blot: flag

Figure 6

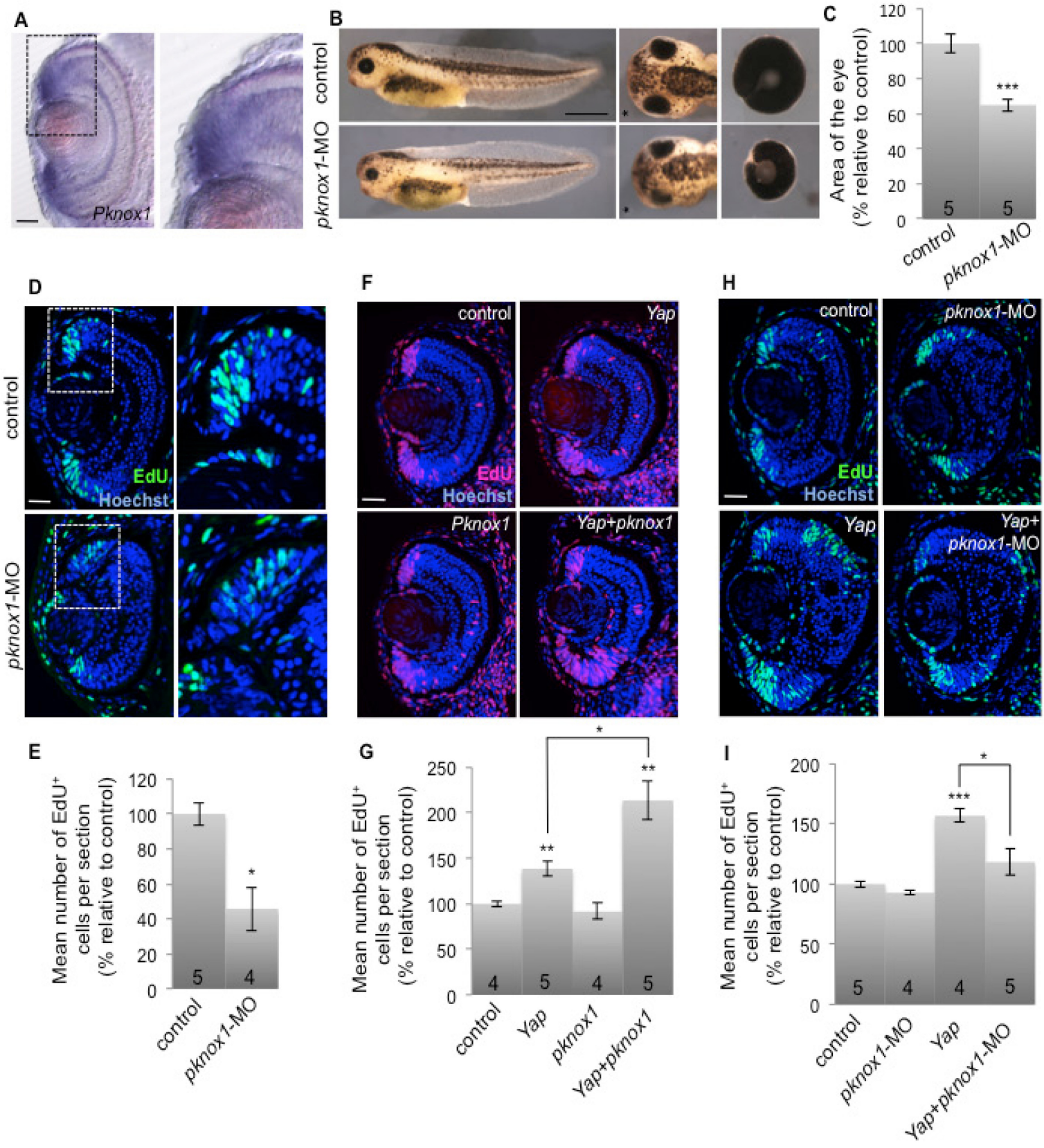

A
Pknox1
B
control
pknox1-MO
C
Area of the eye
(% relative to control)
120
100
80
60
40
20
0
***
5
5
control
pknox1-MO
D
control
pknox1-MO
EdU
Hoechst
F
control
Yap
EdU
Hoechst
Pknox1
Yap+pknox1
H
control
pknox1-MO
EdU
Hoechst
Yap
Yap+
pknox1-MO
E
Mean number of EdU+
cells per section
(% relative to control)
120
100
80
60
40
20
0
*
5
4
control
pknox1-MO
G
Mean number of EdU+
cells per section
(% relative to control)
250
200
150
100
50
0
*
**
**
4
5
4
5
control
Yap
pknox1
Yap+pknox1
I
Mean number of EdU+
cells per section
(% relative to control)
200
150
100
50
0
*
***
5
4
4
5
control
pknox1-MO
Yap
Yap+pknox1-MO

Figure 7

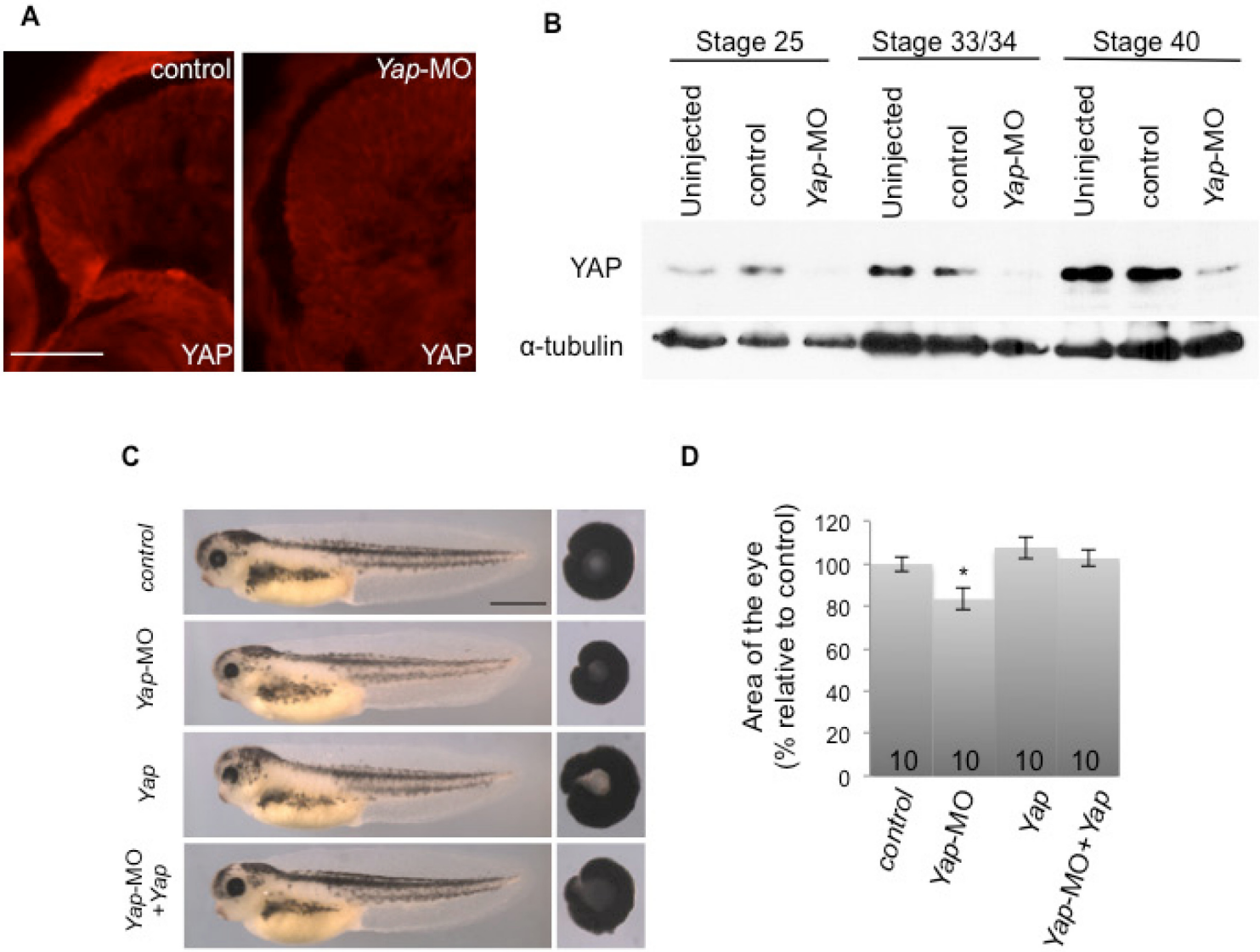
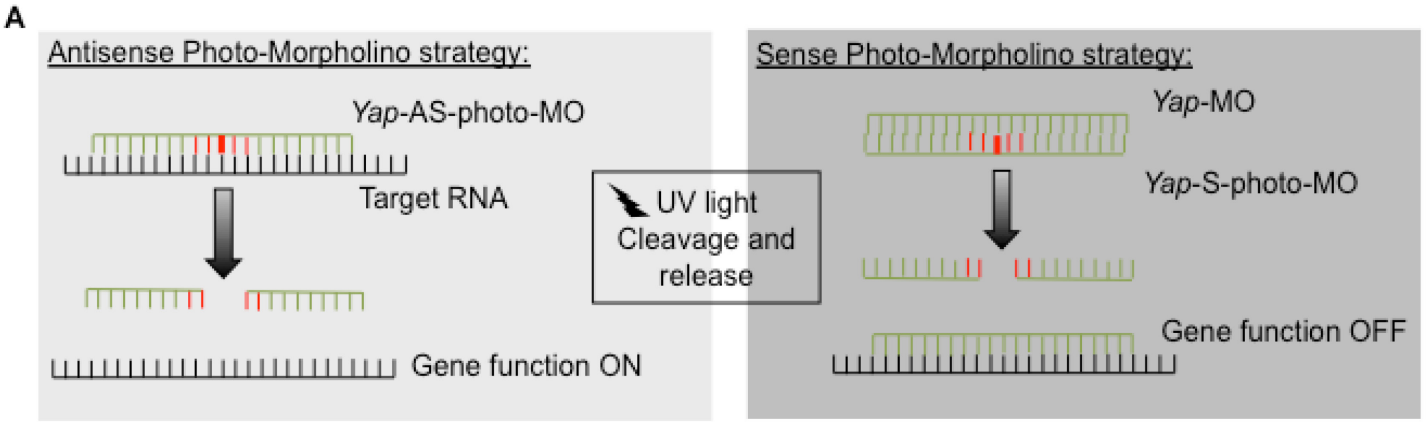
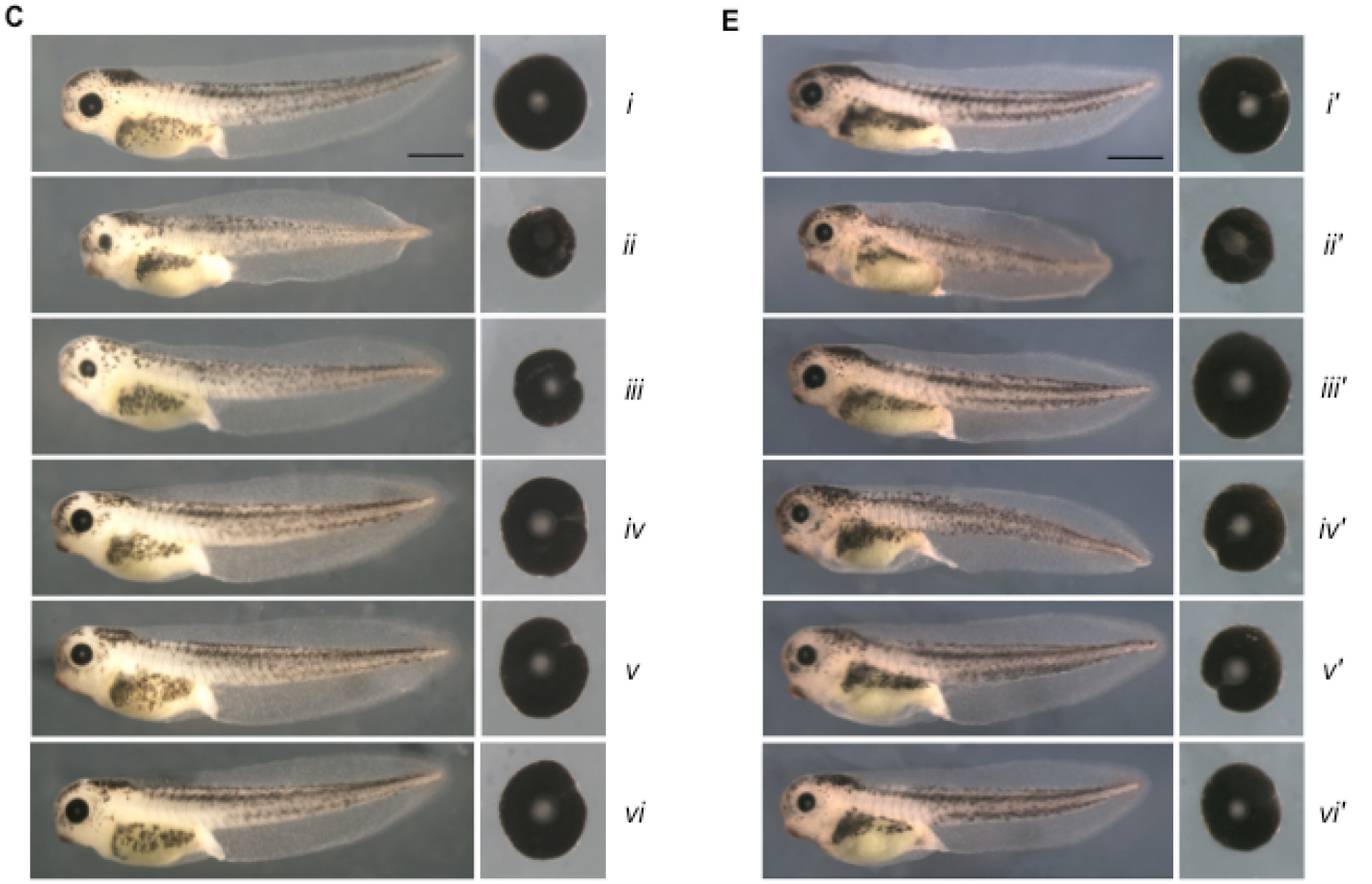

A
control
Yap-MO
YAP
YAP
B
Stage 25
Stage 33/34
Stage 40
Uninjected
control
Yap-MO
Uninjected
control
Yap-MO
Uninjected
control
Yap-MO
YAP
α-tubulin
C
control
Yap-MO
Yap
Yap-MO +Yap
D
Area of the eye
(% relative to control)
120
100
80
60
40
20
0
*
10
10
10
10
control
Yap-MO
Yap
Yap-MO+ Yap

Figure S1.



B

	UV Stage 4	UV Stage 33/34	UV Stage 37/38	no UV
control				*i, i'*
Yap-MO				*ii, ii'*
Yap-AS-photo-MO	*iv*	*v*	*vi*	*iii*
Yap-S-photo-MO+*Yap*-MO	*iv'*	*v'*	*vi'*	*iii'*



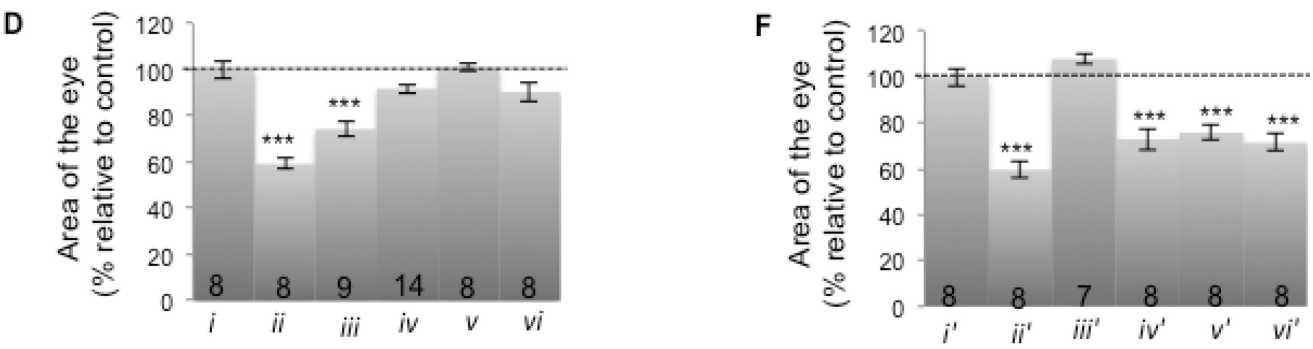
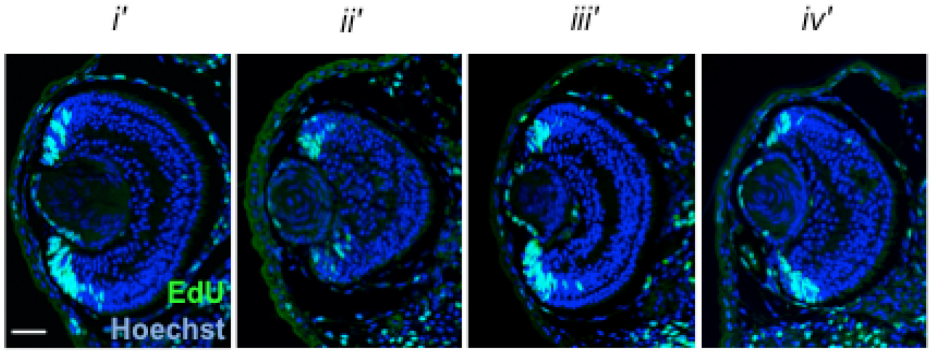


Figure S2.

A

	no UV	UV stage 37/38
control	*i'*	
Yap-MO	*ii'*	
Yap-S-photo-MO+*Yap*-MO	*iii'*	*iv'*



B

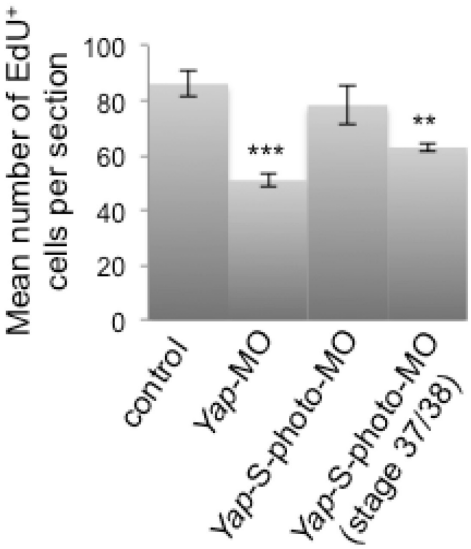


Figure S3.

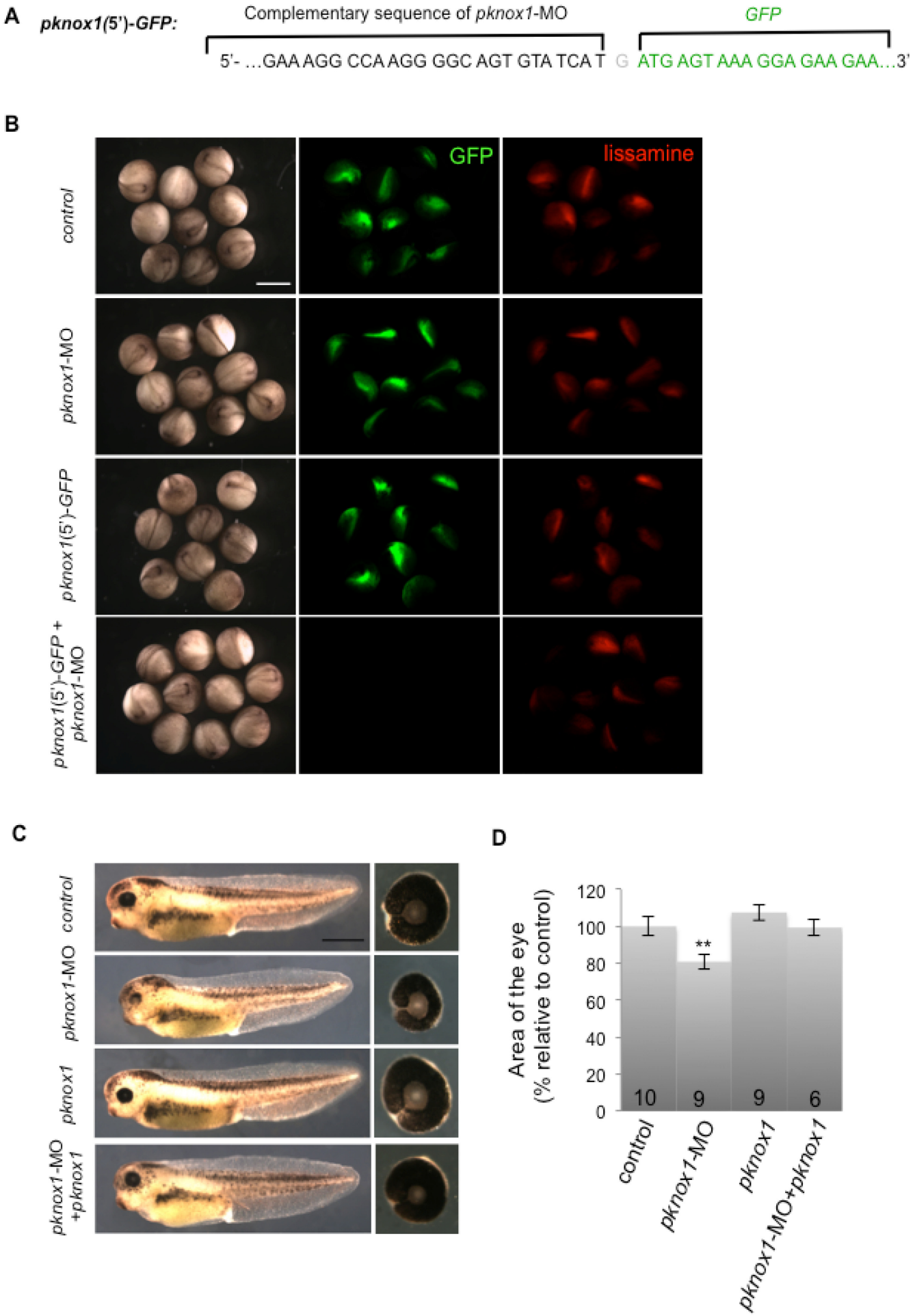

A
pknox1(5')-GFP:
Complementary sequence of pknox1-MO
GFP
5'- …GAA AGG CCA AGG GGC AGT GTA TCA T G ATG AGT AAA GGA GAA GAA…3'
B
GFP
lissamine
control
pknox1-MO
pknox1(5')-GFP
pknox1(5')-GFP + pknox1-MO
C
control
pknox1-MO
pknox1
pknox1-MO +pknox1
D
Area of the eye (% relative to control)
120
100
80
60
40
20
0
**
10
9
9
6
control
pknox1-MO
pknox1
pknox1-MO+pknox1

Figure S4.

Morpholinos	sequence
Yap-MO	TAGGAGACTGTGGGTCACTTCACCA-Lissamine
Yap-MO with 5 mismatch	TAGCAGAGTGTGGCTCAGTTCACGA-Lissamine
pknox1-MO	ATGATACACTGCCCCTTGGCCTTTC-Lissamine
pknox1-MO with 5 mismatch	ATCATAGACTGCCCGTTGCCCTTTG-Lissamine
Yap1-AS-photo-MO	TAGGAGACTGTGPGTCACTTCACC
Yap1-S-photo-MO	TGAAGTGACPCACAGTCTCC
Sandard control-MO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA

qPCR primers	sequence
c-Myc forward	GGCGGAACGAGCTTAAGTTG
c-Myc reverse	CGCCACCTCGGGTACCT
ODC forward	GCTTCTGGAGCGGGCAAAGGA
ODC reverse	CCAAGCTCAGCCCCCATGTCA
RPL8 forward	CCACGTGTCCGTGGTGTGGCTA
RPL8 reverse	GCGCAGACGACCAGTACGACGA

Supplementary Table S1. Sequences of Morpholino oligonucleotides and primers used in the study.

Table S1

Antibodies	Dilution	Company	Technique
Primary mouse monoclonal antibodies			
anti-H2AX	1:50	Millipore	retina IF [(1) (2)]
anti-HA	1:300	Sigma	HEK293T IF
anti-myc	1:200	Invitrogen	HEK293T IF
anti-PCNA	1:1000	Dako	retina IF [(3)]
anti-YAP	1:50	Abcam	retina IF [(1)]
Primary rabbit polyclonal antibodies			
anti-Flag	1:300 / 1:4000	Sigma	HEK293T IF / HEK293T WB
anti-HA	1:4000	Sigma	HEK293T WB
anti-PH3	1:500	Millipore	retina IF
anti-YAP	1:1000	Santa Cruz Biotechnology	*Xenopus* WB
anti-α-tubulin	1:1000	Abcam	*Xenopus* WB
Secondary goat antibodies			
Alexa 448 Anti-mouse or rabbit	1:1000	Molecular Probes	retina IF
Alexa 546 Anti-mouse or rabbit	1:1000	Molecular Probes	HEK293T IF
Alexa 647 Anti-mouse or rabbit	1:1000	Molecular Probes	HEK293T and retina IF
Alexa 694 Anti-mouse or rabbit	1:1000	Molecular Probes	retina IF

Supplementary Table S2. List of antibodies used in the study. [(1)] Amplification using M.O.M Immunodetection kit (Vector Laboratories). [(2)] Antigen unmasking by 5 min incubation in 2N HCl solution and 20ug/ml RNase treatment. [(3)] Fixation in Bouin solution and antigen unmasking by 9 min heating in boiling 10mM sodium citrate and 0.05% tween buffer and by 45 min incubation in 2N HCl solution. IF: Immunofluorecence; WB: Western blot.

Table S2

Target	Accession	Target Region	Target Sequence
			Cell cycle genes
cdc-2	NM_001086624.1	875-975	GAGGATTTCCGCACGAAAAGCTATGTTGCACCCCTACTTCGATGACTTGGAT AAGTCCAGCCTTCCCGCCAATCAGATTAGAAATTAAAACGGCAAATGT
cdc25c-a	NM_001087787.1	2297-2397	AAGCAGAGAAAAAAACCTAAACCCACTCAGTCTGCAAGCTCCAGAACTAAC TTAGAGAATGGGCAGAATAACTGCGCTGCAGTTGAGACAACATGTAATA
cdk2	NM_001090651.1	235-335	CATACGGAAAACAAGCTCTACCTTGTCTTCGAGTTCCTTAACCAAGATCTGA AGAAATTCATGGACCGGTCAAACATTTCTGGAATTTCATTGGCCCTAG
cyclin A2	NM_001096243.1	61-161	ATCGGTGTGCACGGTATGGCCGACCCTCTGTTGCGGGACGAGAATCAGGA AAATGTTCAGCCCCGAAAGCCCCTCGCCCCTGTGGGTGGACGCACCGTGC
cyclin B1	NM_001088520.1	854-954	AATTGGAGAGGTTGACTCTGTACATCACACACTGGCTAAATACCTAATCGAG CTGGTTATGACAGACTATGACATGGTGCACATACCTCCATCACAGTTG
cyclin D1	NM_001086776.1	904-1004	AAAAACATGGTGGATGAAGTGGACATCTCCTGCACCCCGACCGATGTCCGA GACGTCAACATCTGACATCAAACGGATCACAGACATTTTTTTTTGCTCA
cyclin D2	NM_001096348.1	49-149	ATAAGCGCAGGGAGCAGCAATAAGGCTCAGCGGCAGAGTGGGGCTCAACT ACTATCCCGGCAACGGGGGGAGGGGAATCATCCAGTGGTAGCGCCCAAGG
cyclinE	NM_001087977.1	35-135	CTCGCCTCGTCACATCTGCCGCTGCTCTTGTCCGTCTCCTTTCGCCATTGG ATCCGGTGCGTGGGACAGAAAAGTTACCCTTCATTCATTACAAAGCCCT
ink4d/p19	NM_001093415.1	787-887	TATAGTTCAGCATGTTTGTTACTGACTGCGGAGAGCTGCAATAGTACCAATG CCCTATATATTGTTCTAAATACTGGGAACAACTGCAGCACCCTTCAAG
ki67	NM_001135081.1	2812-2912	CAGGACATGCAGATTCTCCTGCCACAATCCTTGTTGGAAGAGCTCATACAAG AACGGTCAACCCAACTGGATATGTTCCTAAAATTGTGCAAAACCAAGC
p21Xic2	AY573848.1	346-446	CCAGAATTGTGAAAGCAGCGATTCAGGCAAACGAAAACAAAAGCTGATCAC AGATTTTTATCCTGTCAAGCGGAGATGTTCACCCGTGCCCAGCCTCCAT
p27Xic1	NM_001088319.1	816-916	TACCGAGATCCGTGGCTCCGGGGACTGCTGAATCCACGGGGTTATTCGTTT CTACTTGGTATCTGGAGATTGTGGCAATAAGGGACTTGTTTCGTGTGCC
p53	NM_001088098.1	1781-1881	CATCTGTGTGTGGGACAACCAGTTATTTATTTGGGCTAGCTGCAGGCTTTTT ATTATGTGACCCTATTTGTGAGGATATGAATGAGCCCTGCTGTGGCCA
pcna	NM_001087542.1	812-912	GAAGCTTCTTAATGTCTGAACTAGCTTATTTTATAAACCTCAACTGAACGTCC AATGGCGCTTTCACACACCTGCCTTGTTTTAACAGCTTTGGCTGAAC
Xic3	AY573849.1	117-217	TTGGCCCGGGACTTTGAGCGGAGCCTTCGGGCGATGGAGGAAGAGAAACG CGAGAAGTGGAACTTCGACTTCCGCAACTACCGGCCGCTACCGGGGCCCC
			House keeping genes
gapdh	NM_001087098.1	773-873	ACCTGCCGCCTGCAGAAGCCGGCCAAGTACGATGACATCAAGGCCGCCAT TAAGACTGCATCAGAGGGCCCAATGAAGGGAATCCTGGGATACACACAAG
odc	NM_001086698.1	855-955	GGATATAATTGGTGTGAGTTTCCATGTTGGCAGTGGCTGCACTGATCCACAG ACTTATGTACAAGCTGTCTCAGATGCACGATGTGTCTTTGACATGGGG
H4	NM_001094457.1	129-229	GGAGAGGGGGAGTCAAGCGCATCTCTGGCCTCATCTATGAGGAGACTCGT GGGGTCCTCAAGGTTTTCCTGGAGAATGTCATCCGGGACGCCGTCACCTA

Supplementary Table S3. Sequences used in the NanoString experiment.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

CHAPITRE VII: DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. L'INTERACTION DES VOIES WNT ET HEDGEHOG DANS LE CONTROLE DE LA BALANCE PROLIFERATION/DIFFERENCIATION DANS LA RETINE POST-EMBRYONNAIRE

1) Mise en évidence d'une interaction antagoniste entre les voies Wnt et Hedgehog dans la rétine post-embryonnaire

L'étude de l'interaction des voies Wnt et Hedgehog dans la rétine post-embryonnaire a permis de mettre en évidence les effets opposés de ces voies sur la prolifération des cellules de la ZMC et de montrer que ces deux voies s'antagonisent mutuellement. De plus, les morphogènes Wnt et Hedgehog sont exprimés dans des territoires totalement exclusifs au sein de la rétine. Ainsi cette étude nous a permis de révéler un antagonisme inattendu entre les signaux Wnt et Hedgehog qui pourrait être à l'origine du contrôle très fin de la balance prolifération/différenciation nécessaire au maintien de la ZMC. Les résultats de ce projet ont été surprenants étant donné que les voies Wnt et Hedgehog sont toutes les deux décrites dans la littérature comme jouant un rôle essentiel dans la maintenance des cellules souches neurales adultes (Bowman et al., 2013)(Ihrie et al., 2011)(Petrova, Garcia, & Joyner, 2013)(Varela-Nallar & Inestrosa, 2013). Cependant, notre modèle est en accord avec les données observées dans la niche des cellules souches intestinales adultes dans laquelle une régulation négative réciproque des deux voies est également décrite (van den Brink et al., 2004)(van Dop et al., 2009). Dans un contexte neural, les interactions entre les voies Wnt et Hedgehog ont été seulement étudiées au cours du développement embryonnaire et les résultats restent controversés. Les voies Wnt et Hedgehog agissent de façon similaire sur la progression du cycle cellulaire des progéniteurs neuraux (Alvarez-Medina et al., 2009) alors qu'elles possèdent des relations antagonistes dans la mise en place du patterning dorso-ventral de la moelle épinière (Le Dréau & Martí, 2012)(Ulloa & Marti 2010). De façon similaire à nos observations, les auteurs de cette dernière étude montrent que les ligands Wnt et Hedgehog sont exprimés dans des territoires d'expression totalement exclusifs. L'ensemble de ces données nous permettent ainsi d'imaginer l'existence de gradients opposés des activités des voies Wnt et Hedgehog dans la ZMC (Figure 73).

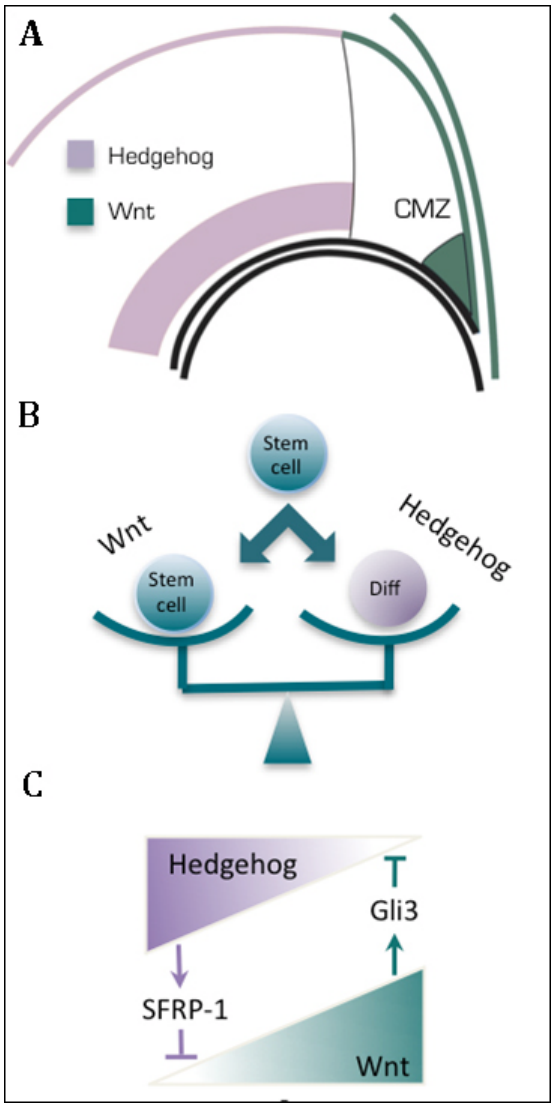


Figure 73: Modèle de l'interaction entre les voies Wnt et Hedgehog dans la rétine post-embryonnaire du xénope. **(A)** Schéma représentant les domaines d'expression mutuellement exclusifs des ligands Wnt et Hedgehog dans la rétine post-embryonnaire. **(B)** Schéma montrant les effets opposés des voies sur la balance prolifération/différenciation. **(C)** Illustration des activités antagonistes des voies Wnt et Hedgehog dans la ZMC et des potentiels acteurs moléculaires sous-jacents. Dans ce modèle hypothétique de gradients d'activité, la voie Wnt régulerait négativement la voie Hedgehog *via* la régulation transcriptionnelle du répresseur GLI3 et au contraire, la voie Hedgehog régulerait négativement la voie Wnt *via* la régulation transcriptionnelle de SFRP-1.

2) Les voies Wnt et Hedgehog possèdent des effets opposés sur la sortie du cycle cellulaire

Les rôles opposés des voies Wnt et Hedgehog sur le comportement des cellules de la ZMC mis en évidence dans nos travaux pourraient être en partie expliqués par l'effet de ces deux voies sur la sortie de cycle cellulaire. En effet, les expériences de "birthdating" visant à analyser la sortie de cycle des cellules de la ZMC montrent que les voies Wnt et Hedgehog ont des effets totalement opposés sur ce paramètre. Alors que l'activation de la voie Wnt provoque un retard de la sortie de cycle, celle de la voie Hedgehog provoque au contraire un sortie prématurée des progéniteurs rétiniens. Cependant, l'analyse du rôle des voies de signalisation Wnt et Hedgehog sur la cinétique du cycle cellulaire n'a pas encore été réalisée dans la rétine post-embryonnaire. Des résultats plus anciens de l'équipe montrent que la voie Hedgehog possède une fonction ambivalente en favorisant à la fois la sortie du cycle cellulaire des précurseurs de la rétine embryonnaire tout en accélérant la vitesse de division de ces cellules (Locker et al., 2006). Concernant la voie Wnt, les effets de la perturbation de cette voie sur la cinétique du cycle cellulaire dans la rétine ne sont pas connus. Comprendre le rôle de ces deux voies dans la régulation du cycle cellulaire des cellules de la ZMC est donc une perspective intéressante afin d'approfondir la compréhension de notre modèle.

3) *Sfrp1* et *Gli3* sont des acteurs moléculaires essentiels de l'interaction entre les voies de signalisation Wnt et Hedgehog

Notre étude suggère que l'inhibition mutuelle entre les voies Wnt et Hedgehog passe par la régulation transcriptionnelle du gène suppresseur de tumeur *Sfrp-1* et du facteur de transcription *Gli3* (Figure 73). Notre modèle présente ainsi de nombreuses similitudes avec le modèle hypothétique décrit dans la crypte intestinale adulte. Dans cette étude, l'identification de sites de fixation GLI dans la région promotrice du gène *Sfrp1* et l'analyse des patrons d'expression du ligand *Indian Hedgehog*, de *Wnt6* et *Sfrp1* ont amené les auteurs à proposer un modèle selon lequel la régulation de *Sfrp-1* par la voie Hedgehog pourrait être nécessaire à la restriction de l'expression des gènes cibles de Wnt au sein de la population de cellules souches et de progéniteurs (Katoh & Katoh, 2006). Dans la moelle épinière en développement, la régulation de *Gli3* par la voie Wnt semble être à l'origine de la restriction de l'activité d'Hedgehog dans les structures ventrales de ce modèle (Alvarez Medina et al. 2008). Enfin, cette interaction implique certainement d'autres acteurs moléculaires qui restent à identifier.

Le facteur Sufu pourrait par exemple être un candidat potentiel puisqu'il est décrit dans la littérature comme un régulateur clé de la voie de signalisation Hedgehog chez les mammifères (Taylor et al., 2002)(Cooper et al., 2005)(Svärd et al., 2006)(Varjosalo, Li, & Taipale, 2006). De façon intéressante, il semble agir comme un médiateur des interactions entre les voies Wnt et Hedgehog chez le xénope (Min et al., 2011).

4) Conclusion

L'ensemble de nos résultats a permis de mettre en évidence une interaction antagoniste des voies Wnt et Hedgehog dans le contrôle de la rétinogenèse adulte. Cette interaction semble être à l'origine de la fine régulation de la balance prolifération/différenciation nécessaire au maintien de la population de cellules souches et de progéniteurs de la ZMC. Dans la poursuite de ce projet, il serait intéressant de tester cette interaction antagoniste dans les autres zones de neurogenèse du cerveau.

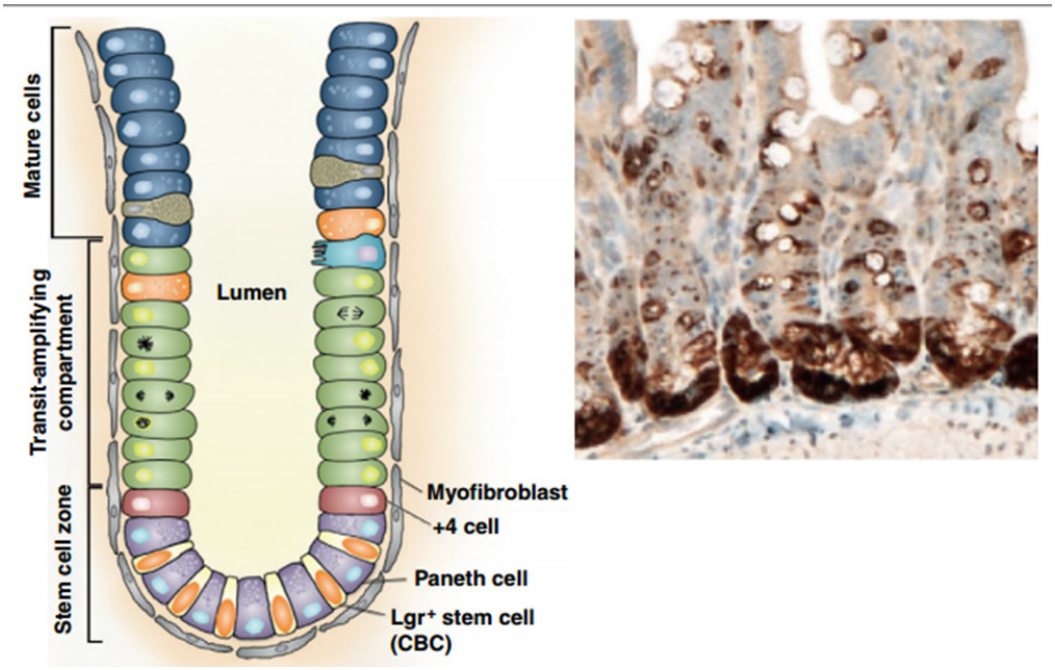


Figure 74: Expression de *Yap* dans la crypte intestinale chez la souris. **(A gauche)** Organisation de la crypte intestinale. **(A droite)** Localisation de *Yap* dans la crypte intestinale d'une souris sauvage. *Yap* est fortement exprimé dans la crypte intestinale où sont localisées les cellules souches. D'après (Ramos & Camargo, 2012).

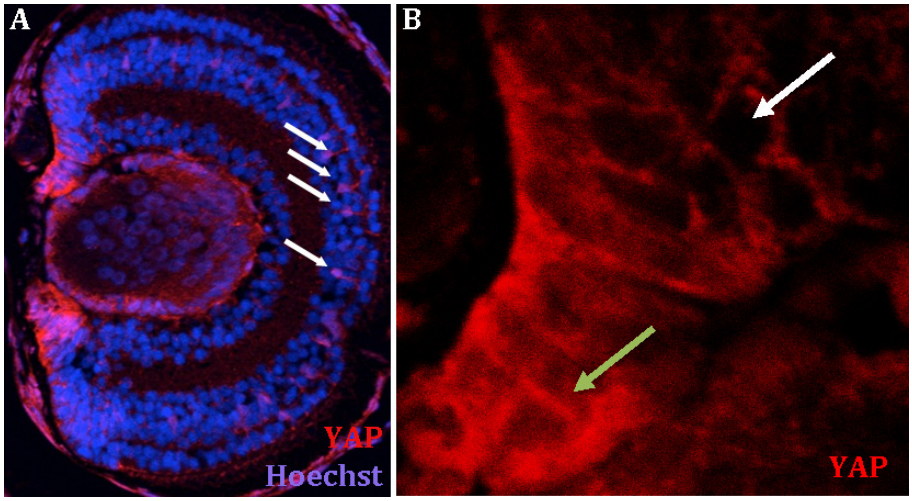


Figure 75: Localisation de la protéine YAP dans la rétine post-embryonnaire du xénope. **(A)** Immunomarquage utilisant un anticorps anti-YAP réalisé sur une coupe de rétine transversale au stade 40. Un marquage est visible à la périphérie de la ZMC (dans la zone contenant les cellules souches et les jeunes progéniteurs rétiniens) et dans les cellules gliales de Müller dans la rétine centrale (flèches). **(B)** Agrandissement de la région périphérique de la ZMC. YAP semble à la fois nucléaire et cytoplasmique dans les cellules souches à l'extrême périphérie de la ZMC (flèche verte) et semble être de plus en plus exclu du noyau dans les progéniteurs de la région plus centrale (flèche blanche).

2. ROLE DE L'EFFECTEUR DE LA VOIE HIPPO, YAP, DANS LES CELLULES SOUCHES DE LA RETINE POST-EMBRYONNAIRE

1) Le gène *Yap*: un nouveau marqueur de cellules souches

La rétine du xénope est un excellent modèle dans l'identification de nouveaux marqueurs des cellules souches neurales. Au sein de ce tissu, la population de cellules souches est confinée à l'intérieur d'une niche localisée à la périphérie de la rétine. Les expériences d'hybridation *in situ* et d'immunomarquages réalisées montrent que le co-activateur de la voie de signalisation Hippo, *Yap*, possède une expression très restreinte à la population de cellules souches et de jeunes progéniteurs de la ZMC. Dans certains organes comme l'intestin ou le cerveau antérieur en développement, l'expression de *Yap* est également forte dans le compartiment des cellules souches (Figure 74)(Camargo et al., 2007)(Li Y, 2012). D'autres tissus comme l'épiderme ou les muscles squelettiques présentent un gradient beaucoup plus large du niveau de l'expression de *Yap* en fonction de l'état de différenciation des cellules (Haiying Zhang et al., 2011)(Watt et al., 2010). Dans ce cas, YAP possède une expression nucléaire au sein de la population de cellules souches et au contraire, une expression cytoplasmique dans les cellules différenciées. Cette organisation spatiale liant l'expression de YAP à l'activité proliférative des cellules est observée dans de nombreux organes et indique que l'activité transcriptionnelle de YAP pourrait être importante dans la maintenance des populations de cellules souches. Dans la rétine post-embryonnaire du xénope, des changements de la localisation cellulaire de YAP sont également visibles au sein de la ZMC. Bien que l'organisation des cellules de cette zone rende cette observation difficile, il est possible de distinguer une localisation de YAP à la fois nucléaire et cytoplasmique dans les cellules souches de la ZMC et une localisation exclusivement cytoplasmique dans la zone des jeunes progéniteurs (Figure 75). Ce résultat doit être confirmé en améliorant la résolution des images.

L'analyse de l'expression de YAP dans la rétine post-embryonnaire a également révélé une expression intéressante de ce facteur au sein des cellules gliales de Müller. Ces cellules sont les principales cellules gliales de la rétine. Bien qu'elles restent dormantes et ne possèdent pas d'activité proliférative dans la rétine des individus sains, ces cellules sont dotées d'un potentiel de cellules souches, capables de se réactiver et de générer des précurseurs rétiniens en cas de lésions grâce à l'addition de facteurs de croissance chez certaines espèces comme les poissons, les oiseaux ou encore les rongeurs (Fausett & Goldman, 2006)(Ooto et al., 2004)(Wan et al., 2008). De façon intéressante, l'expression de *Yap* dans les cellules de Müller a également été observée dans la rétine post-natale chez la souris (données du laboratoire non publiées). Ces données ont ainsi fait l'objet de nouveaux projets dans mon laboratoire d'accueil visant à réaliser l'étude fonctionnelle de *Yap* dans ces cellules. Les premiers résultats de cette étude indiquent que de façon très surprenante, la protéine YAP est majoritairement exprimée dans le noyau des cellules de Müller malgré l'absence d'activité proliférative de ces cellules. Comprendre quelle est la fonction de YAP dans cette population de cellules et de savoir si ce facteur contribue à conférer à ces cellules leur potentiel "souche" reste une question à élucider.

2) Le gène *Yap*: un gène nécessaire au contrôle du "timing" de la phase S du cycle cellulaire des cellules souches de la rétine post-embryonnaire

Au début de ma thèse, les premiers résultats montrant une expression de *Yap* dans les cellules souches de la rétine post-embryonnaire ainsi que les données de la littérature sur son rôle dans les différentes populations de cellules souches, m'ont conduit à émettre l'hypothèse que ce facteur pouvait jouer un rôle dans le contrôle de la prolifération des cellules souches rétiniennes responsable de la croissance continue de notre modèle. Durant la première partie de ma thèse, les résultats des nombreuses expériences d'incorporation d'EdU réalisées dans des contextes de gain et de perte de fonction *Yap* venaient en effet soutenir cette hypothèse. C'est seulement au cours de ma dernière année de thèse que l'analyse plus poussée du phénotype de perte de fonction m'a fait interpréter mes résultats de façon très différente. Les différents rebondissements vécus au cours de mon projet m'ont donc amener à beaucoup de prudence concernant l'interprétation parfois trop rapide des expériences d'incorporation d'EdU réalisées dans de nombreuses publications afin d'observer un impact sur la prolifération cellulaire.

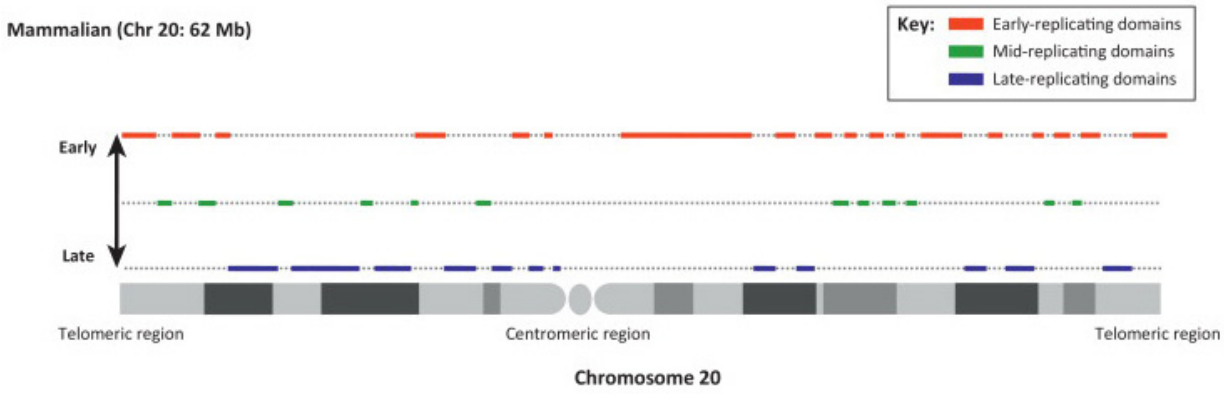


Figure 76: Exemple de programme temporel de la réplication chez les mammifères. Profil du programme temporel de réplication du chromosome 20 humain (62 Mb) dans les cellules K652. Des domaines de réplication précoces, moyens et tardifs sont représentés par des barres horizontales rouges, vertes et bleues respectivement. Ces données ont été déduites à partir des résultats de (Hansen et al., 2010). D'après (Yamazaki et al., 2013).

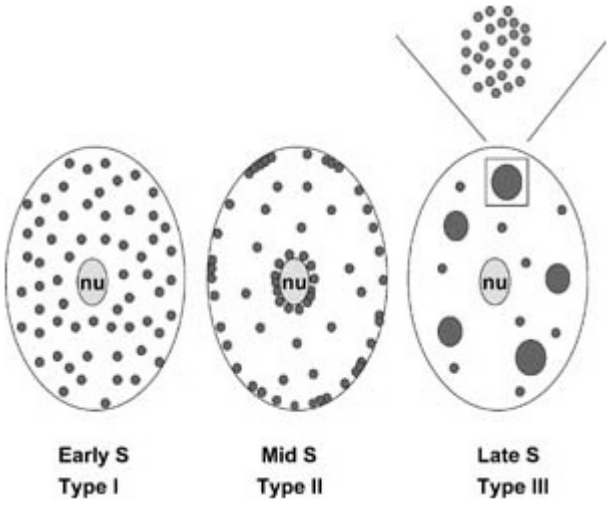


Figure 77: Représentation schématique des trois principaux profils de réplication au cours de la phase S chez les mammifères. Les profils de "type I" (observés en début de phase S) présentent de nombreux foyers de petite taille, répartis dans l'ensemble du noyau. Dans les profils de "type II", les foyers de réplication possèdent une taille similaire mais se concentrent au niveau de l'enveloppe nucléaire et du nucléole. Les profils de "type III" (observés en fin de phase S) montrent des foyers de réplication de plus grande taille et moins nombreux. D'après (Koberna et al., 2004).

Les résultats extrêmement surprenants de raccourcissement de la phase S du cycle cellulaire en contexte de perte de fonction *Yap* nous ont donc conduit dans de nouvelles directions de recherche visant à étudier les mécanismes clés de la réplication de l'ADN comme la régulation des mécanismes impliqués dans l'initiation de cette phase. Les recherches bibliographiques dans ce domaine de recherche complètement nouveau pour moi, ont été très enrichissantes et m'ont permis de réaliser que très peu de choses étaient en réalité connues sur ce processus, pourtant indispensable au maintien de l'intégrité du génome.

Durant la phase de synthèse de l'ADN, un grand nombre d'origines de réplication sont mises en place sur les chromosomes avant le démarrage de la phase S chez les vertébrés. Cependant, seul un petit nombre d'entre elles sont utilisées pour assurer la duplication totale du matériel génétique et parmi les origines de réplications activées, toutes ne sont pas "allumées" au même moment. Certaines régions du génome sont répliquées dès le début de la phase S à partir d'origines dites précoces, tandis que d'autres sont contrôlées par des origines tardives (Figure 76 et 77)(Zink, 2006). Tout au long de la phase S, de nombreux points de contrôles garantissent donc une fréquence d'initiation correcte des origines de réplication (Méchali et al., 2013). Cependant, les mécanismes à l'origine de cette régulation temporelle sont aujourd'hui mal compris. Deux modèles hypothétiques pouvant expliquer comment la cellule distingue les origines de réplication précoces et tardives ont été décrits dans la littérature (Figure 78)(Yamazaki et al., 2013). Dans le premier, les origines de réplication précoces sont marquées et possèdent une étiquette moléculaire permettant leur activation dès le début de la phase S. Le contexte chromatinien des origines semble faire partie de cette étiquette moléculaire mais ne permet pas d'expliquer à lui seul cette régulation. Le second modèle considère au contraire que toutes les origines sont équivalentes et peuvent être activées dès le début de la phase de synthèse. Ce modèle fait intervenir un facteur hypothétique afin d'inhiber l'activation des origines de réplication tardives. Dans notre modèle, YAP pourrait être l'un de ces facteurs hypothétiques permettant d'inhiber les origines de réplication tardives en début de phase S. En absence de YAP, l'ensemble des origines de réplication seraient ainsi activées dès le début de la phase de réplication. Cette absence de régulation pourrait en effet permettre de répliquer beaucoup plus rapidement le matériel génétique et d'expliquer ainsi le raccourcissement de la durée de la phase S observé en condition de perte de fonction de *Yap*. L'analyse des foyers de réplication au cours de la phase de synthèse de l'ADN dans la zone des cellules souches que nous avons réalisée est en accord avec cette hypothèse. En effet, la proportion de cellules présentant un profil de réplication tardive est beaucoup plus faible dans un contexte de perte de fonction *Yap* montrant une altération du programme temporel de réplication dans ces cellules.

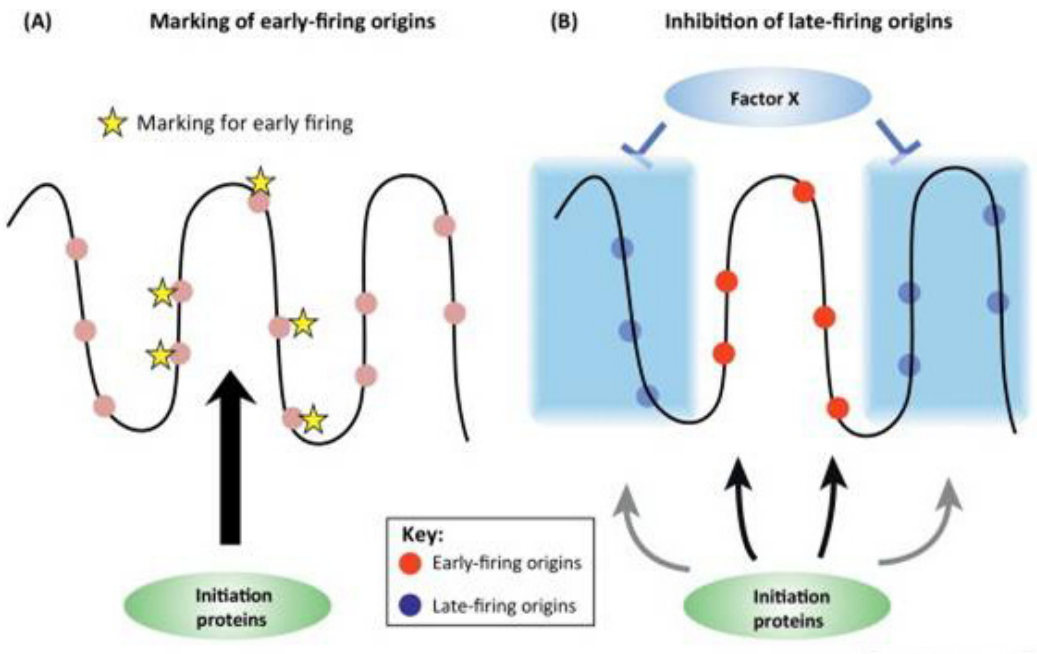


Figure 78: Modèles hypothétiques permettant d'expliquer le programme temporel de la réplication. **(A)** Les origines de réplication précoces pourraient être marquées par une étiquette moléculaire. La structure de la chromatine ou des modifications covalentes des composants du complexe de pré-initiation de la réplication pourraient faire partie de ce marquage. **(B)** Le deuxième modèle fait intervenir un facteur hypothétique qui permettrait d'inhiber l'activation des origines de réplication tardives en empêchant le recrutement de facteurs d'initiation. D'après (Yamazaki et al., 2013).

L'ensemble de nos résultats suggère que la protéine YAP joue un rôle essentiel dans le contrôle du "timing" de la phase S du cycle cellulaire des cellules souches de la rétine post-embryonnaire et cet effet est associé à une forte augmentation de l'expression du gène *c-Myc*. Récemment, en plus des nombreux rôles connus du facteur c-MYC, une équipe a mis en évidence une nouvelle fonction de cette protéine au cours de la réplication de l'ADN, de façon indépendante de ses effets transcriptionnels (Dominguez-Sola et al., 2007). Dans cette étude, les auteurs utilisent des œufs de xénope dépourvus d'une machinerie transcriptionnelle compétente afin de démontrer cette nouvelle fonction de c-MYC dans la progression de la phase S. Les résultats montrent que c-MYC est un régulateur clé de l'étape d'initiation de la réplication pouvant interagir avec les protéines du complexe de pré-réplication MCM, ORC2, CDC6 et CDT1 (Dominguez-Sola et al., 2007). De plus, la surexpression de *c-Myc* provoque une accélération importante de la phase de synthèse dans des fibroblastes primaires humains en culture alors qu'au contraire, son inhibition entraîne un allongement de la durée de cette phase du cycle cellulaire (Robinson et al., 2009). Il a été mis en évidence que la surexpression de *c-Myc* perturbe le programme spatio-temporel de réplication en augmentant la densité des origines de réplication précoce (Srinivasan et al., 2013). Par des expériences de peignages moléculaire, cette équipe a montré que l'activation des origines de réplication se déroule plus précocement et de façon plus synchronisée en condition de surexpression du gène *c-Myc*. L'augmentation de l'expression du gène *c-Myc* en condition de perte de fonction *Yap* suggère que ce facteur pourrait être un acteur moléculaire essentiel de la régulation du processus de réplication médié par YAP au sein des cellules souches rétiniennes.

Chez la drosophile, l'homologue de Myc (*d-Myc)* a été décrit comme une cible transcriptionnelle de YKI (Ziosi et al. 2010)(Neto-Silva et al. 2010)(Stocker, 2010) et une forte augmentation de l'expression du gène *Myc* a également été observée dans un contexte de surexpression de *Yap* dans différents modèles de cellules cancéreuses (Xiao et al. 2013)(Schütte et al. 2014). Ces données sont donc en contradiction avec celles observées dans la rétine post-embryonnaire. En effet, *c-Myc* ne semble pas être une cible transriptionnelle de YAP dans notre modèle étant donné qu'une augmentation de son expression a été observée dans nos expériences de perte de fonction. L'interaction entre c-Myc et YAP semble donc dépendre du contexte cellulaire.

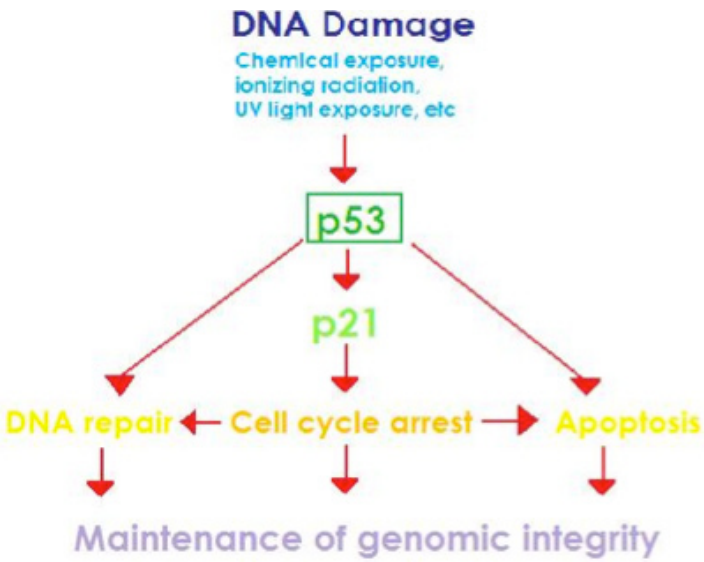


Figure 79: Schéma simplifié de la voie p53/p21. Schéma représentatif de la voie p53 activée en réponse à des dommages de l'ADN montrant que p21 est une cible de p53. D'après les données de (Harris & Levine, 2005).

L'ensemble de nos résultats nous a ainsi conduit à proposer un modèle original dans lequel YAP jouerait un rôle clé dans le contrôle du programme temporel de la phase de synthèse de l'ADN des cellules souches de la rétine post-embryonnaire. Dans la littérature, le rôle physiologique de *Yap* dans la cinétique du cycle cellulaire restait jusqu'à maintenant incertain et son rôle dans les processus de réplication n'avait jamais été étudié auparavant. L'originalité de notre modèle repose sur le phénotype de raccourcissement de la phase S observé. En effet, très peu d'exemples de la littérature décrivent un phénotype similaire. Dans le but de confirmer notre modèle, il serait maintenant intéressant de réaliser des expériences de "peignage moléculaire" permettant de visualiser directement l'activation des origines de réplication et la progression des fourches le long de chromosomes individuels étirés sur des lames de verre.

3) L'inhibition de *Yap* est à l'origine de stress réplicatif important

La perturbation de l'activation différée des origines de réplication dans les cellules souches de la rétine post-embryonnaire est à l'origine de stress réplicatif. Cette notion utilisée dans la littérature est définie comme une modification anormale des paramètres de réplication tels qu'une variation de la vitesse des fourches de réplication, une modification du profil d'activation des origines et/ou une variation de la durée de la phase S. Toutes ces perturbations peuvent entraîner des arrêts et des effondrements des fourches de réplication entraînant la génération de cassures double-brin de l'ADN. De façon intéressante, la surexpression de *c-Myc* a été associée dans la littérature à une activation des voies de réponse de dommages de l'ADN dans un grand nombre de modèles cellulaires *in vitro* (Pusapati et al., 2006)(Reimann et al., 2007)(Gorrini et al., 2007). Nos résultats montrent une augmentation de l'expression de certains composants de la voie de réponse aux dommages de l'ADN comme le marqueur de cassures double-brins de l'ADN, γ-H2AX ou encore la protéine p53 en condition de perte de fonction du gène *Yap*. La réponse cellulaire déclenchée suite à la détection d'un dommage de l'ADN fait rapidement intervenir les kinases ATR et ATM. Cette dernière est spécifiquement activée en présence de cassures double-brins de l'ADN. En présence de ces cassures, l'environnement chromatinien est modifié et l'histone H2AX est rapidement phosphorylée par ATM (il est alors nommé γH2AX). Au niveau de la cassure, cette phosphorylation va permettre le remodelage de la chromatine et va faciliter l'interaction entre ATM et ses différents substrats. Ces interactions vont ainsi activer plusieurs voies de signalisation conduisant à différentes réponses cellulaires tels que l'activation des voies de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire et également la mort cellulaire. La protéine p53 joue un rôle crucial dans l'ensemble de ces réponses (Figure 79).

L'activation de p53 permet le déclenchement d'un programme transcriptionnel spécifique de chaque stress cellulaire détecté (Harris & Levine, 2005). Concernant l'arrêt du cycle cellulaire, la protéine p21 est le médiateur principal de p53 dans ce processus. L'expression de p21 permet un arrêt du cycle au cours de la phase G1 tardive provoquant une inhibition de la transition G1-S. Ainsi, sa surexpression provoque un allongement de la phase G1 (Li et al., 2012a). En accord avec ces données, l'augmentation de l'expression de p21 observée dans un contexte de perte de fonction de *Yap* pourrait ainsi expliquer l'allongement important de la phase G1 obtenue dans les expériences d'EdU cumulatif.

Enfin, le déclenchement de la réponse de mort cellulaire est sous la dépendance de la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques de p53. Ce dernier est également capable de contribuer au déclenchement du processus apoptotique par des actions indépendantes de son activité transcriptionnelle. Dans notre modèle, cette réponse pourrait être responsable de l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques observées en absence de *Yap*.

4) PKNOX1 est un nouveau partenaire de YAP dans les cellules souches de la rétine post-embryonnaire.

L'identification du ou des facteurs de transcription partenaire de YAP dans notre modèle a été une partie essentielle de ce projet dans le but de comprendre le mode d'action de la protéine YAP dans les cellules souches de la rétine post-embryonnaire. Ce projet nous a conduit à l'étude d'un nouveau partenaire de YAP chez les vertébrés, la protéine PKNOX1 (PBX-Regulating Protein-1)(aussi nommé PREP1) appartenant à la famille Meis/Prep dont l'homologue chez la drosophile (Homothorax, Hth) est déjà connu comme un partenaire de YKI (Peng et al., 2009b). A ce jour, aucune donnée n'a encore été publiée sur son interaction avec YAP/ TAZ chez les vertébrés.

PKNOX1/PREP1 est un facteur de transcription à homéodomaine appartenant à la superfamille d'homéogènes appelée TALE (Three Amino acid Loop Extension)(Longobardi et al., 2014). La classe TALE présente la particularité de posséder un homéodomaine contenant 63 résidus au lieu de 60 (expliquant son nom). Cette superfamille inclut la sous-famille des facteurs PBC (PBX class) et des facteurs MEINOX (famille MEIS (Myeloid Ecotropic Integration Site)/PKNOX). Une caractéristique importante de la superfamille TALE est la capacité que possèdent ses composants à former des dimères, en particulier entre les facteurs PBC et MEINOX. Un site de fixation des protéines PBX a d'ailleurs été localisé au sein de la protéine PKNOX1

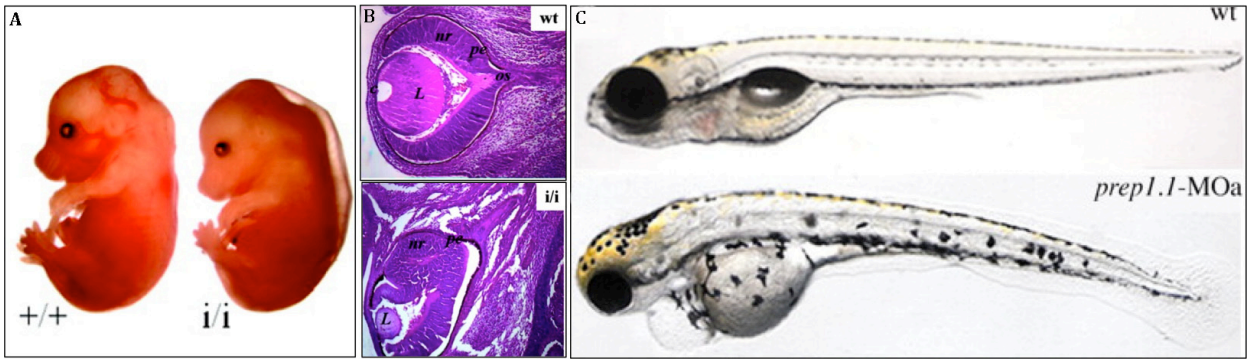


Figure 80: Phénotype de perte de fonction *Pknox1*. **(A)** Morphologie des embryons de souris Prep1$^{i/i}$. **(B)** Coupes transversales de l'œil des embryons Prep1$^{i/i}$ au stade E14.5 après une coloration hématoxyline-éosine. D'après (Ferretti et al., 2006) **(C)** Morphologie des embryons de poisson-zèbre injectés avec un MO-*Prep1* au stade une cellule. D'après (Deflorian et al., 2004)Abréviations utilisées: L:lens; nr: neural retina; pe: pigmented retinal epithelium; c:cornea; os:optic stalk.

(Díaz et al., 2007). De façon intéressante, malgré leur fonction de facteur de transcription, les protéines TALE possèdent une localisation majoritairement cytoplasmique dans de nombreux modèles cellulaires étudiés. Leur localisation nucléaire semble dépendre de leur état de dimérisation. Concernant la protéine PKNOX1, elle ne possède pas de signal NLS (Nuclear Localization Signal), son interaction avec une protéine PBX semble nécessaire à sa localisation nucléaire (Jens Berthelsen et al., 1999). Ces données amènent donc à discuter du rôle des protéines PBX dans notre modèle. En effet, les expériences de BiFC réalisées dans les cellules HEK293T en culture montrent une interaction du complexe YAP/PKNOX1 majoritairement cytoplasmique. Le mode d'action de la protéine PKNOX1 dans notre modèle n'est pas encore compris. Cette dernière pourrait être seulement responsable de la stabilisation de YAP dans le cytoplasme. Des expériences utilisant un système rapporteur luciférase de l'activité YAP/TEAD (8xGTIIC) ont été mis en place au laboratoire dans le but de tester l'implication de PKNOX1 dans l'activité transcriptionnelle de YAP. Si effectivement PKNOX1 joue un rôle dans cette activité, la surexpression d'une protéine PBX pourrait être nécessaire afin d'induire la translocation nucléaire du complexe YAP/PKNOX1. De façon intéressante, les yeux des embryons *Pbx4*$^{-/-}$ chez le poisson présentent un phénotype de petit œil similaire à celui obtenu après une perte de fonction de *Yap* ou de *Pknox1* (Rikhof et al., 2000)(French et al., 2007). Il serait donc intéressant d'analyser le patron d'expression des différents gènes *Pbx* dans la rétine post-embryonnaire chez le xénope.

Les résultats de notre étude montrent une interaction fonctionnelle entre YAP et PKNOX1 dans la rétine post-embryonnaire. En accord avec ce résultat, les recherches bibliographiques sur les différentes fonctions biologiques de *Pknox1* ont révélé de nombreuses similitudes avec celles de *Yap*.

Tout d'abord, la protéine PKNOX1 joue un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire chez la souris. En effet, les souris KO pour ce gène meurent très tôt au cours du développement due à une mort des cellules de l'épiblaste dépendante de l'activation de p53 (Fernandez-Diaz et al., 2010). L'analyse des phénotypes des nouveau-nés présentant une mutation hypomorphe du gène *Pknox1* (exprimant 3 à 7% de la protéine par rapport à des souris WT) montrent généralement une hypoplasie, particulièrement visible dans l'œil (Figure 80)(Ferretti et al., 2006). De la même façon, un phénotype de petit œil a également été observé chez le poisson zèbre (Figure 80)(Deflorian et al., 2004).

De façon intéressante, de récentes études commencent à mettre en évidence le rôle de *Pknox1* dans le contrôle des propriétés des cellules souches. En effet, *Pknox1* semble impliqué dans la régulation de l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques et dans le contrôle

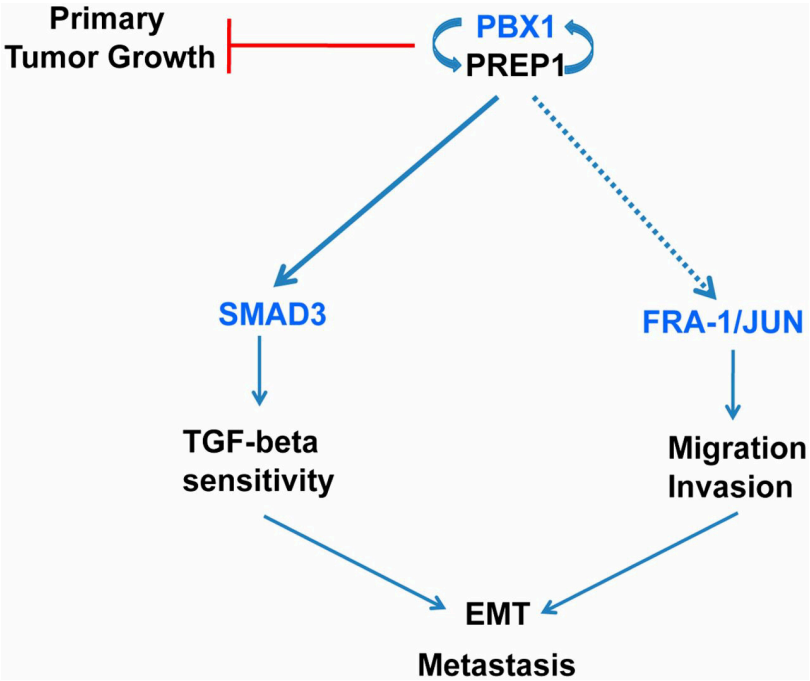


Figure 81: Modèle hypothètique représentant les interactions entre PKNOX1-PBX1 et SMAD3 dans l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. D'après (Risolino et al., 2014)

de la balance quiescence/prolifération de ces cellules dans le foie fœtal chez la souris (Modica et al., 2014)(Di Rosa et al., 2007).

Les fonctions du facteur de transcription PKNOX1 décrites dans la littérature sont complexes et diffèrent considérablement d'un contexte cellulaire à l'autre. En effet, de façon contradictoire, ce dernier semble pouvoir agir à la fois comme un suppresseur de tumeur et un inducteur de la transition épithélio-mésenchymateuse. L'haplo-insuffisance du gène *Pknox1* dans le modèle de souris transgénique EμMyc, dans lequel le gène *c-Myc* est constitutivement exprimé dans les cellules lymphatiques, accélère la croissance tumorale et réduit de façon significatif la survie des animaux (Longobardi et al., 2010). De plus, les embryons Pknox1$^{i/i}$ développent spontanément des lésions précancéreuses et dans certains cas des lymphomes et des carcinomes. Cependant, malgré sa fonction inhibitrice de la croissance tumorale, une autre étude a récemment mis en évidence que PKNOX1 pouvait également stimuler la transition épithélio-mésenchymateuse provoquant ainsi la formation de métastases dans des lignées cellulaires d'adénocarcinomes du poumon (Risolino et al., 2014). Dans cette étude, la perte de fonction de *Pknox1* inhibe l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse induite par une activation de la voie du TGF-β. Les auteurs montrent que le complexe PKNOX1-PBX1 (ici encore, nécessaire à leur localisation nucléaire), modifie la réponse cellulaire induite par la voie du TGF-β en régulant spécifiquement l'expression de SMAD3 (Figure 81). Dans la littérature, YAP joue un rôle dans le contrôle du transport nucléo-cytoplasmique des protéines SMAD/2/3 (Varelas et al., 2010). Ainsi, bien que les mécanismes d'actions semblent différents, YAP et PKNOX1 pourraient agir ensemble *via* la régulation du facteurs SMAD3.

Enfin, en accord avec notre modèle impliquant le complexe YAP/PKNOX1 dans le contrôle du processus de réplication de l'ADN, une équipe a montré que *Pknox1* était nécessaire au maintien de la stabilité génomique des cellules en culture (Iotti et al., 2011). Les cellules déficientes pour *Pknox1* présentent une activation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN observée dans cette article par une augmentation du nombre de foci γH2AX et p-ATM, des aneuploïdies ainsi qu'une fréquence élevée de chromosomes possédant des structures aberrantes.

Pour conclure, l'ensemble des résultats des analyses fonctionnelles de *Pknox1* décrites dans la littérature montre que ce facteur est un candidat idéal pour agir de façon coopérative avec YAP dans les cellules souches de la rétine post-embryonnaire. Dans le but de poursuivre la caractérisation de l'interaction entre YAP et PKNOX1, l'identification des domaines protéiques nécessaires à la formation de ce complexe est une perspective intéressante. En effet, le facteur PKNOX1 ne possède pas de motifs PPxY permettant d'interagir avec les domaines WW de YAP,

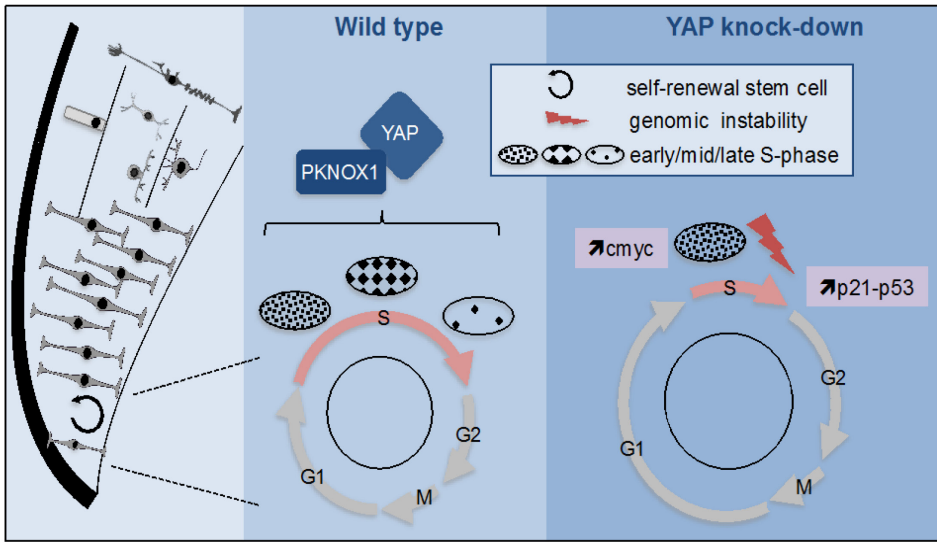


Figure 82: Modèle hypothétique représentant le rôle du complexe YAP/PKNOX dans la régulation du "timing" de la phase S des cellules souches de la ZMC. **(A gauche)** En contexte physiologique, le complexe YAP-PKNOX est nécessaire au bon déroulement du programme temporel de la réplication des cellules souches de la rétine post-embryonnaire. **(A droite)** En condition de perte de fonction de Yap, la surexpression du gène *c-myc* pourrait être à l'origine de l'activation de l'ensemble des origines de réplication dès le début de la phase S réduisant ainsi considérablement la longueur de cette phase. Cette perturbation du "timing" de la phase S est responsable de l'augmentation de l'expression de *p53* et de *p21,* eux mêmes responsable de l'augmentation de l'apoptose et de l'allongement de la phase G1 dans les cellules de la ZMC respectivement.

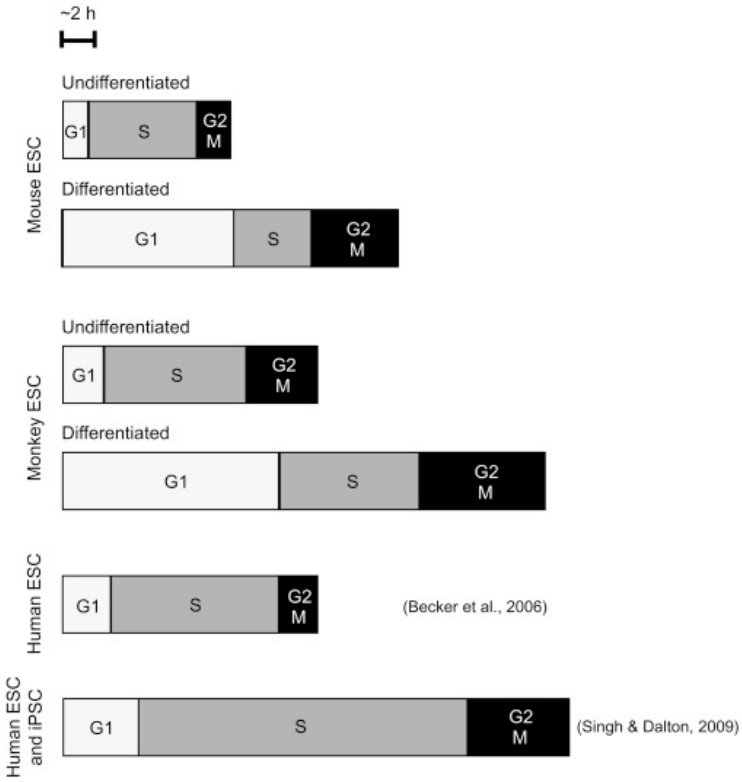


Figure 83: Structure du cycle cellulaire des cellules souches embryonnaires indifférenciées et différenciées.
D'après (Tsubouchi & Fisher, 2013)

classiquement décrit dans la littérature comme un domaine essentiel à l'interaction de nombreux composants au sein de la voie de signalisation Hippo. Ces données pourraient ainsi faciliter la recherche de nouveaux partenaires de YAP chez les vertébrés.

5) Conclusion

Dans le modèle hypothétique que nous proposons, le complexe YAP/PKNOX1 semble être responsable de la régulation du programme temporel de la phase de synthèse de l'ADN des cellules souches rétiniennes adultes (Figure 82). Ce programme visant à garantir la réplication du matériel génétique sans erreurs est particulièrement important dans les populations de cellules souches afin d'empêcher la transmission de mutations à leur descendance. L'analyse du cycle cellulaire des cellules souches embryonnaires avant et après leur différenciation illustrent bien cette donnée. Malgré un cycle cellulaire plus court (dû à un raccourcissement des phases G1 et G2), ces cellules possèdent une très longue phase S qui réduit considérablement après leur différenciation (Figure 83). Une observation similaire a été apportée dans le cas des cellules souches et des progéniteurs neuraux dans le cerveau qui possèdent une phase S en moyenne trois fois plus longue que les cellules en cours de différenciation (Arai et al., 2011), de la même façon que les cellules souches de la ZMC chez le xénope. Etant donné l'importance du bon déroulement de cette phase de synthèse dans ces cellules, il serait intéressant de savoir si cette fonction du complexe YAP/PKNOX1 est conservée dans d'autres populations de cellules souches.

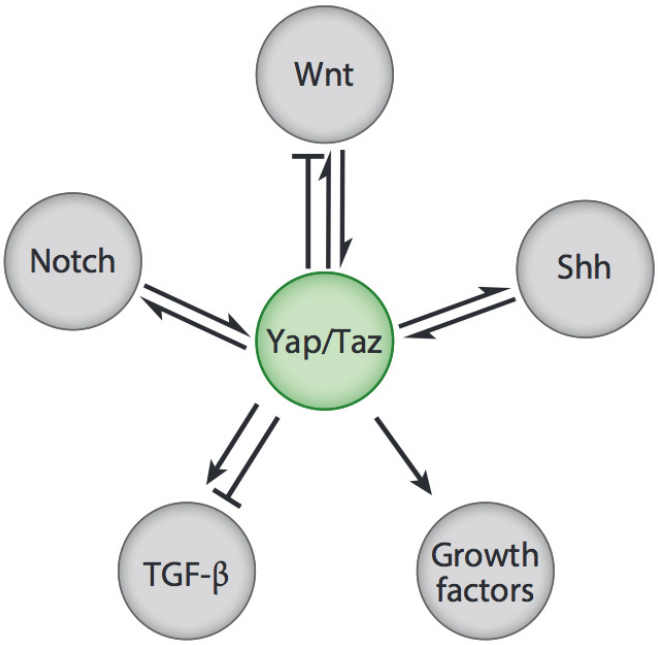


Figure 84: Schéma récapitulatif des interactions existantes entre YAP/TAZ et les autres voies de signalisation.
D'après (F.-X. Yu, Meng, Plouffe, & Guan, 2014)

CHAPITRE VIII: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'objectif général de mon projet de thèse a été d'étudier les interactions entre les voies de signalisation Wnt et Hedgehog et de réaliser l'étude fonctionnelle de *Yap*, l'effecteur de la voie Hippo indépendamment. Au début de mon stage de master, un des aspects important de mon projet de recherche consistait à lier ces deux projets en étudiant les interactions entre les trois voies de signalisation Wnt, Hedgehog et Hippo afin de mettre en évidence une partie du réseau de signalisation nécessaire à l'activité des cellules souches de la rétine post-embryonnaire. Les données de la littérature suggèrent en effet l'existence de nombreuses interactions entre ces voies dans différents modèles (Figure 84)(voir partie II 4. de l'introduction). Dans un premier temps, la stratégie expérimentale utilisée pour étudier cette problématique a été de moduler les voies de signalisation Wnt ou Hedgehog grâce aux agents pharmacologiques mis au point au laboratoire et d'analyser les conséquences sur l'expression des différents composants de la voie Hippo. Les résultats préliminaires de ces expériences suggèrent l'existence d'une interaction entre ces trois voies dans la rétine post-embryonnaire bien que ces données restent incomplètes et difficile à interpréter en raison de la variabilité des phénotypes observés. Dans le but d'identifier d'éventuels acteurs moléculaires à l'intersection des trois voies de signalisation de manière plus global et quantitative, une expérience de Nanostring a été réalisée sur des échantillons traités par les différents agents pharmacologiques permettant d'activer ou d'inhiber les voies Wnt et Hedgehog. Cette expérience comprenait également l'analyse de l'expression des différents composants des voies Wnt et Hedgehog en perte de fonction du gène *Yap*. Cette étude a fait l'objet d'une partie du projet de recherche de R. Chemouny au cours de son stage de M2 au laboratoire. De façon étonnante, le résultat de cette expérience n'a montré aucune variation importante de l'expression des gènes cibles analysés, suggérant que les interactions entre ces voies n'interviennent pas au niveau transcriptionnel. D'autre part, la mise en évidence du rôle de *Yap* dans le contrôle du processus de réplication de l'ADN des cellules souches rétiniennes ont plutôt conduit les perspectives de ce projet vers l'identification de nouveaux facteurs intervenant durant la phase de réplication qui pourrait interagir avec l'effecteur de la voie Hippo.

ANNEXES

Article n°3

Parain K., Mazurier N., Bronchain O., Borday C., Cabochette P., Chesneau A., Colozza G., El Yakoubi W., Hamdache J., Locker M., Gilchrist M., Pollet N., Perron M. (2011)

A large scale screen for neural stem cell markers in Xenopus retina.

Developmental Neurobiology

A Large Scale Screen for Neural Stem Cell Markers in *Xenopus* Retina

Karine Parain,[1]* Nicolas Mazurier,[1]* Odile Bronchain,[1] Caroline Borday,[1] Pauline Cabochette,[1] Albert Chesneau,[1] Gabriele Colozza,[1] Warif El Yakoubi,[1] Johanna Hamdache,[1] Morgane Locker,[1] Michael J. Gilchrist,[2] Nicolas Pollet,[3] Muriel Perron[1]

[1] Neurobiology and Development Laboratory, CNRS UPR 3294, Univ Paris-Sud, Orsay, France

[2] MRC National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London NW7 1AA, United Kingdom

[3] Metamorphosys—iSSB, Genopole, CNRS, University of Evry, Evry, France

Received 26 April 2011; revised 24 August 2011; accepted 25 August 2011

ABSTRACT: **Neural stem cell research suffers from a lack of molecular markers to specifically assess stem or progenitor cell properties. The organization of the *Xenopus* ciliary marginal zone (CMZ) in the retina allows the spatial distinction of these two cell types: stem cells are confined to the most peripheral region, while progenitors are more central. Despite this clear advantage, very few genes specifically expressed in retinal stem cells have been discovered so far in this model. To gain insight into the molecular signature of these cells, we performed a large-scale expression screen in the *Xenopus* CMZ, establishing it as a model system for stem cell gene profiling. Eighteen genes expressed specifically in the CMZ stem cell compartment were retrieved and are discussed here. These encode various types of proteins, including factors associated with proliferation, mitotic spindle organization, DNA/RNA processing, and cell adhesion. In addition, the publication of this work in a special issue on *Xenopus* prompted us to give a more general illustration of the value of large-scale screens in this model species. Thus, beyond neural stem cell specific genes, we give a broader highlight of our screen outcome, describing in particular other retinal cell markers that we found. Finally, we present how these can all be easily retrieved through a novel module we developed in the web-based annotation tool XenMARK, and illustrate the potential of this powerful searchable database in the context of the retina.** © 2011 Wiley Periodicals, Inc. Develop Neurobiol 72: 491–506, 2012

Keywords: **neural stem cells; retina; XenMARK; *Xenopus***

INTRODUCTION

The vertebrate retina is a model system for studying mechanisms underlying neural cell proliferation, fate choice, signaling, and tissue patterning. This comes from its accessibility and remarkable simplicity. The retina indeed only contains six major classes of neurons and a single class of glial cell, the Müller glia. These cell types can be easily distinguished from one another by their morphology and laminar position within the three nuclear layers of the retina. The

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence to: M. Perron (muriel.perron@u-psud.fr).

Contract grant sponsors: ANR (06-JCJC-0108-01 and 056054); CNRS, Univ Paris-Sud, Retina France, ARC (1108); Medical Research Council (U.1175.01.007.00002.01); Genopole, Genoscope, CNRS and University of Evry.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

Published online 30 August 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).
DOI 10.1002/dneu.20973

outer nuclear layer consists of two major classes of photoreceptors, rods and cones. The inner nuclear layer contains Müller cells, as well as horizontal, bipolar, and amacrine interneurons. The ganglion cell layer is composed of displaced amacrine cells and retinal ganglion cells, which send their axons through the optic nerve to various targets in the brain. Significantly, in fish and amphibians, a site of continuous neurogenesis is found in the periphery of the mature retina, allowing it to grow throughout the lifespan of these animals. This region, called the ciliary marginal zone (CMZ), consists of a ring of cells organized in a spatial gradient of differentiation: at the extreme edge lie multipotent and self-renewing stem cells, while more centrally are situated committed, proliferative progenitors, followed by differentiating neuroblasts and finally post-mitotic neurons. Notably, it has been shown that this spatial order recapitulates the temporal events occurring during embryonic neurogenesis (Perron et al., 1998; Casarosa et al., 2005). In amphibians, ciliary marginal cells participate in the regeneration process after retinal injury (Keefe, 1973; Yoshii et al., 2007). The situation is different in birds and mammals. Hatched chicken retinas contain a population of proliferating cells at the peripheral margin, but their activity is only transient and their neurogenic potential more limited compared to that of fish and amphibians (Fischer and Reh, 2000). A rudimentary CMZ has also been found in newborn opossums (Kubota et al., 2002). Although no similar structure has been recognized in placental mammals, the marginal region of the adult human retina was recently reported to contain cells that express stem cell markers and proliferate in response to EGF (Epidermal Growth Factor (Bhatia et al., 2009)). This led to the proposal that the human retina might be endowed with some regenerative potential. In addition, cells able to clonally expand and express retinal cell markers when cultured *in vitro* (Ahmad et al., 2000; Tropepe et al., 2000; Coles et al., 2004) were identified in the murine and human ciliary body epithelium, a tissue derived from the optic cup and located between the retina and the iris. The ciliary body of the adult mammalian eye might thus harbor a population of retinal stem cells, although in a quiescent state *in vivo*. Despite an open debate on their differentiation capabilities (MacNeil et al., 2007; Cicero et al., 2009; reviewed in Locker et al., 2010), their discovery offered hope for the use of stem cell-based therapies to treat neurodegenerative diseases of the eye, and intensified interest for research in the field of retinal stem cell biology.

Reliable markers of stem and progenitor cells are critical in this context to distinguish and characterize these cell types. The CMZ of amphibians offers an exceptional model to search for such markers *in vivo*, as its spatial organization allows to discriminate the stem cell niche from the progenitor-containing zone. We thus used it as a paradigm to identify retinal stem cell marker genes. To this end, we performed a large scale *in situ* hybridization screen, and identified many novel markers for a number of retinal cell types. To provide a simple discovery method based on gene expression pattern retrieval, we used the XenMARK bioinformatic tool to generate spatial annotation of the 485 images of labeled retinal sections generated in our study. As a useful comparison point, known markers of various retinal cell populations already available in the literature were also included in the database. From our screen, we were able to define 18 previously unknown retinal stem cell marker genes based on their specific expression in the most peripheral region of the CMZ. This represents a huge step in the field of retinal stem cells, given the very low number of such markers described so far.

METHODS

cDNA Libraries

cDNA clones derive from two different Libraries: LIBEST_016859 NIH_XGC_tropTe3 (clones RY0BAD1 and RY0BAD2) and LIBEST_015540 *Xenopus tropicalis* xthr plasmid (clones EC2CAA2 and EC2CAA19).

Large Scale RNA Probe Synthesis

DNA preparations using "Nucleospin Multi-96 Plus Plasmid" were performed following the manufacturer's instructions (Macherey Nagel). Polymerase chain reaction (PCR) amplifications of cDNA inserts were carried out with M13F/M13R or T3/T7 primers in 96-well plates. Digoxigenin-labeled antisense RNA probes were generated with T7 RNA polymerase from about 100 ng of PCR product, according to the manufacturer's instruction (Roche). RNA probes were then purified using sephadex G50 columns in a Multiscreen 96-well plate as previously described (Pollet and Niehrs, 2001).

Large-Scale Whole Mount *In Situ* Hybridization

Xenopus tropicalis embryos were obtained by hormone-induced egg laying and natural spawning. Stage 39 tadpoles were fixed in MEMFA (3.7% formaldehyde, 1× MEM) for at least 2 h at room temperature and stored at −20°C in 100% methanol. The protocol for embryo preparation before *in situ* hybridization mainly derives from the work by Harland (1991). Briefly, embryos were rehydrated and treated with 10 μg/mL proteinase K for 10 min. A bleaching treatment (Broadbent and Read, 1999) was then performed, followed by a 20-min post-fixation in 4% paraformaldehyde plus 0.3%

glutaraldehyde. Embryos were subsequently pre-hybridized at least 4 h in hybridization buffer at 63°C and stored at −20°C for subsequent use. The *in situ* hybridization steps were performed as described by Pollet and Niehrs (2001), with minor additional changes. Briefly, following overnight incubation at 63°C with the probes, specimens were rinsed in 2× Saline-Sodium Citrate (SSC)/hybridization buffer (50:50) and washed for 40 min twice in 2× SSC and twice in 0.2× SSC at 65°C. Before incubation with anti-DIG antibody, embryos were rinsed in TNX (0.1% Tris, 0.05*M* NaCl, 0.1% Triton X100) and incubated for 2 h in TNX/2% BR (Blocking Reagent, Roche). Alkaline Phosphatase-conjugated anti-DIG antibody (Roche 1/10,000) was applied overnight at 4°C or 2 h room temperature in TNX/2% BR. Embryos were then rinsed five times for 1 h in TNX. Alkaline phosphatase activity was revealed using NBT/BCIP substrate (Roche). The hybridization and the washing steps were performed either manually or using an *In Situ* Pro robot (Intavis). Selected embryos were then vibratome sectioned (50 μm).

Imaging and XenMARK Annotation

Whole mount images were captured using an Olympus SZX12 stereomicroscope with a Spot Insight color camera. Retinal sections were analyzed with a M2 Zeiss microscope and images captured with a digital camera AxioCam MRc and AxioVision Rel 7.8 software.

Groups of images were uploaded to XenMARK, the database of queryable gene expression patterns for *Xenopus*. Annotation of expression patterns were performed following previously described procedure (Gilchrist et al., 2009). To extend the XenMARK system to support this work, we added a schematic line drawing of a stage 39 retinal section, from which markers can be retrieved by selecting a zone of interest.

Sequence Analysis and Annotation

Our cDNA sequences were compared to the RefSeq and the *Xenopus tropicalis* genome sequence databases using NCBI BLAST. We accepted a match when aligned sequences were more than 95% identical over at least 200 bp. We then used the matches to RefSeq sequences to assign a gene name and symbol from Xenbase to the corresponding cDNA clone. In parallel, we used matches to the *X. tropicalis* genome sequence to confirm the identity of cDNA clones or to identify the corresponding gene when its sequence was not found in RefSeq. Finally, we extracted the protein sequences for the genes corresponding to our clones, and performed a Gene ontology (GO) annotation using Blast2GO (Conesa et al., 2005).

RESULTS AND DISCUSSION

A Large Scale *In Situ* Hybridization Screen to Isolate Retinal Cell Markers

The main goal of this study was to isolate novel retinal stem cell markers. Taking advantage of the well-characterized spatial organization of the *Xenopus* CMZ, we undertook a large scale *in situ* hybridization screen and looked for genes specifically expressed in its most peripheral stem cell containing region. *Xenopus tropicalis* probes were designed from two sources: (a) partial cDNA sequences from two arbitrarily selected 384-well plates from an embryonic head and retina library which had been EST-sequenced earlier (Fierro et al., 2007) and (b) predicted full-length cDNAs from two 384-well plates entirely sequenced (unpublished data). One thousand one hundred six bacterial clones from these were successfully used to generate PCR templates for RNA probe synthesis. These probes were then tested in whole mount *in situ* hybridizations on stage 39 *Xenopus tropicalis* tadpoles.

From the whole mount expression profiles, 26% of the clones were scored as showing ubiquitous labeling, 27% generated weak or undetectable signal and 47% displayed restricted staining, based on previously described criteria (Pollet et al., 2005). Although the present study focuses on the retina, it is worth mentioning that we found genes of potential interest as markers for a variety of other tissues, such as the liver, pronephros, brain, etc (Fig. 1). For our purposes, specimens exhibiting labeled eyes (n = 485, 44%) were sectioned for further analysis of the precise expression profile.

To sort out expression patterns into distinct categories, we subdivided the eye into nine compartments [Fig. 2(A–I)]: the CMZ at the periphery of the retina (A), comprising a stem cell containing region at the tip (B) and a progenitor containing region in the central part (C), the lens (D), the ganglion cell layer (E), the inner nuclear layer (F), the outer nuclear layer (G), the retinal pigment epithelium (H), and the optic nerve (I). Out of 485 analyzed clones, 371 displayed unambiguous expression patterns in the eye, and amongst those, we scored 95 clones (20%) showing a specific and exclusive expression pattern in one of the nine defined areas (Fig. 2, Table 1, and Supporting Information Table 1).

Retinal Neuron Markers Retrieved from the Screen

Compared to microarray or RNA deep sequencing analyses, this type of screen is quantitatively limited in terms of sorted genes but has the qualitative advantage that it allows for immediate visualization of gene expression specificity as a primary mode of analysis. As far as retinal neurons are concerned, our *in situ* hybridization screen was most successful in isolating specific ganglion cell markers (Fig. 2); indeed we found 33 *Xenopus* genes exclusively

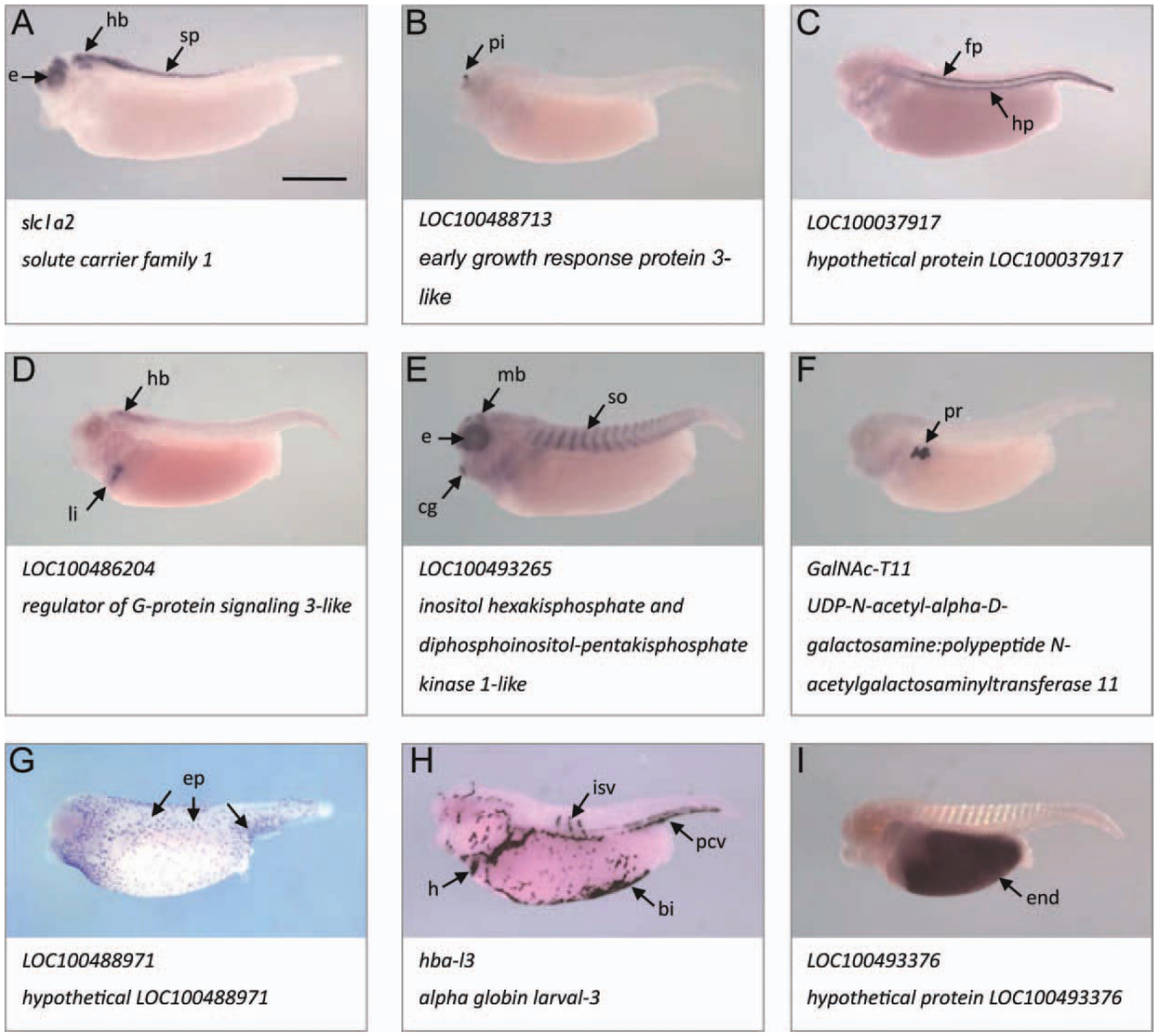


Figure 1 Diversity of whole mount expression profiles retrieved from the screen. Examples of expression patterns obtained from the screen following whole mount *in situ* hybridization on stage 39 *Xenopus tropicalis* tadpoles. As expected from the origin of the cDNA libraries, a large proportion of the clones display expression in the nervous system including the eye (A) or in restricted areas of the nervous system such as the pineal gland (B) or floorplate/hypochord (C). Some are expressed in both the nervous system and in another tissue, such as the liver (D) or the somites (E). Other, however, are exclusively expressed outside the nervous system, for instance in the pronephros (F), in specialized cells of the epidermis, probably ionocytes (G), in blood islands and vessels (H) or in the endoderm (I). bi: blood islands; cg: cement gland; e: eye; end: endoderm; ep: scattered epidermal cells; fp: floorplate; h: heart; hb: hindbrain; hp: hypochord; isv: inter somitic vein; li: liver; mb: midbrain; pcv: posterior cardinal vein; pi: pineal gland; pr: pronephros; so: somites; sp: spinal chord. Tadpoles are shown in lateral view, dorsal to the top and anterior to the left. Gene symbol and gene description are indicated under each panel. Scale bar = 500 μm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

expressed in the ganglion cell layer. One of these is an already known marker of this cell type in *Xenopus*, *neuropilin 1* (Fujisawa et al., 1995), which is involved in axon guidance. Others represent novel markers, and two interesting examples will be given here. The phosphatase slingshot has previously been described to be involved in growth cone motility and neurite extension (Endo et al., 2007; Wen et al.,

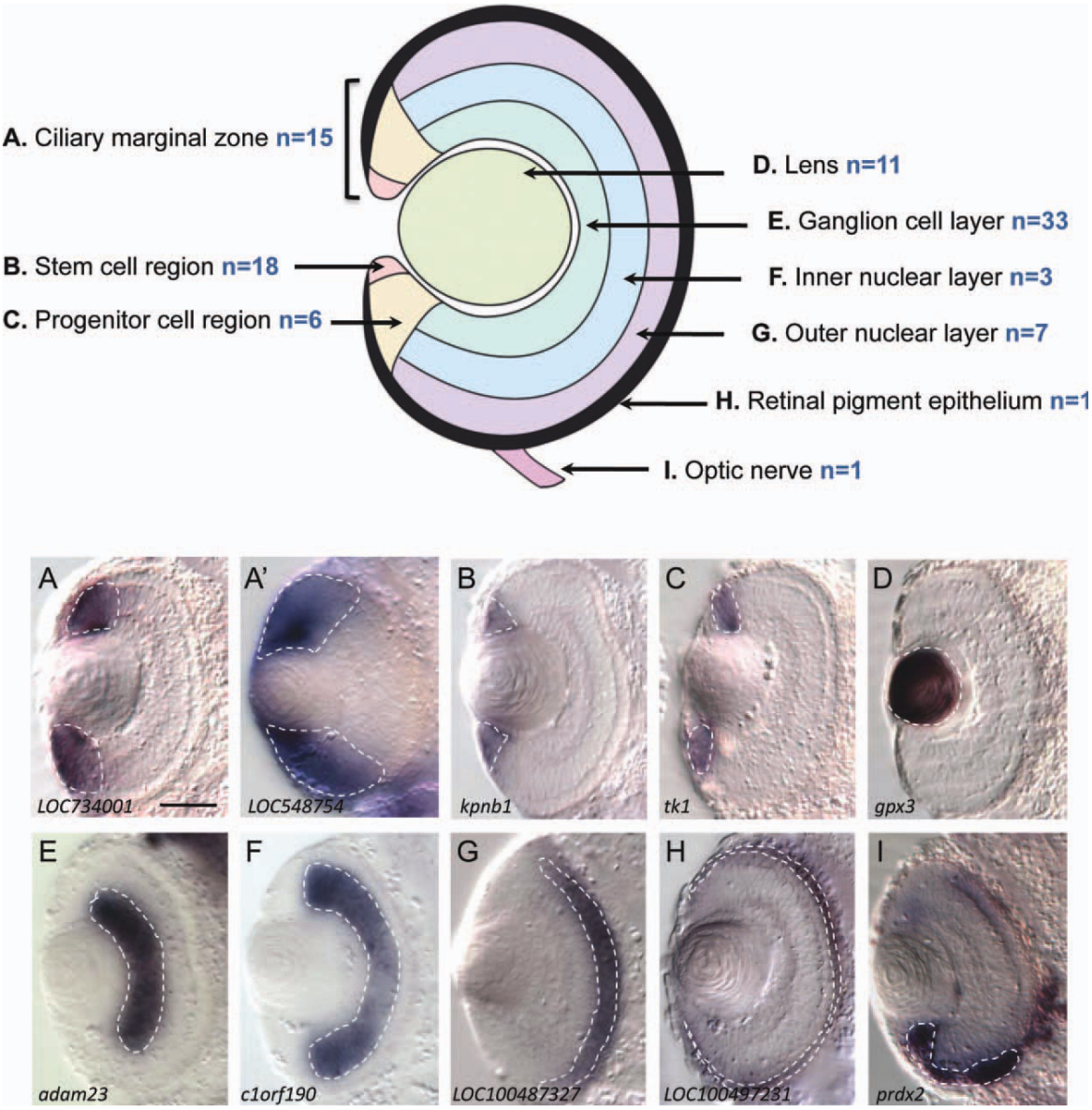


Figure 2 Classification of specific retinal markers retrieved from the screen. Schematic diagram illustrates the chosen subdivisions of the tadpole retina. *n* indicates the number of markers retrieved from the screen that exhibit specific expression in only one of these compartments. Pictures below are stage 39 transverse retinal sections (dorsal up) that provide typical examples of such markers, with a correspondence to the schematic lettering (A–I). A fuzzy staining in the CMZ that invades the nuclear layers (A′) is not considered CMZ-specific. White dotted lines delineate the staining. Gene symbol is indicated under each panel. Scale bar = 50 μm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

2007). Our finding that protein phosphatase slingshot homolog 2-like labels ganglion cells thus makes it a potential candidate as a player in ganglion cell axon growth. The tubby-like proteins (TULPs) are expressed in various cell types of the murine retina (Ikeda et al., 2003). Among them, both *tub* and *Tulp1* genes have been implicated in retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis, two retinal degenerative diseases (Ikeda et al., 2003; Xi et al., 2006). Whilst *Tulp1* is specifically expressed in photoreceptors, *tub* seems to have a broader expression pattern in the adult mouse retina (Ikeda et al., 2003), but has not been described so far during retinal development. Interestingly, we found here that *tub* is

Table 1 List of the 18 Retinal Stem Cell Markers Retrieved from the Screen

	Clone id	Gene Sequence Ref	Gene Symbol	Gene Description
A	RY0BAD1DH05	XM_002943439.1	*alpl*	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney
B	RY0BAD1AB03	NM_001005661.1	*sulf2*	sulfatase 2
C	RY0BAD2BB02	XM_002939535.1	*spry4*	sprouty homolog 4-like
D	RY0BAD1BG08	XM_002932809.1	*gxylt1*	glucoside xylosyltransferase 1 transcript variant 2
E	RY0BAD1BH11	NM_001008078.2	*mgrn1*	mahogunin, ring finger 1
F	EC2CAA19CH04	NM_203539.1	*hes4*	hairy and enhancer of split 4
G	EC2CAA2AA11	NM_203967.1	*nop58*	NOP58 ribonucleoprotein homolog
H	RY0BAD1AH11	XR_098072.1	*LOC100127707*	partial miscRNA
I	EC2CAA2AH01	NM_203689.1	*randp1*	RAN binding protein 1
J	RY0BAD2CF11	XM_002940151.1	*kpnb1*	karyopherin (importin) beta 1
K	EC2CAA2AG04	NM_001016570.2	*aurka*	aurora kinase A
L	RY0BAD2CE12	NM_203859.1	*ncapg*	non-SMC condensin I complex, subunit G
M	RY0BND2CE04	NM_001045766.1	*zmcm3*	zygotic DNA replication licensing factor mcm3
N	RY0BAD2AG02	NM_001008082.1	*mcmbp*	minichromosome maintenance complex binding protein
O	EC2CAA2AD03	NM_001079190	*ssbp1*	single-stranded DNA binding protein 1
P	RY0BAD2CE03	NM_001126979.1	*trmt2a*	TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog A
Q	RY0BAD2DA01	NM_001102684.1	*dnajc27*	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27
R	RY0BAD1BA07	XM_002931571.1	*fndc3b*	Fibronectin type III domain-containing protein 3B-like

specifically expressed in the ganglion cell layer of the *Xenopus* tadpole (see Fig. 7). Whether this is different from the situation in murines remains to be investigated.

Among seven specific markers of the outer nuclear layer, we found a *Xenopus* homologue of creatine kinase, an important enzyme of vertebrate metabolism, known to be present in chick and bovine photoreceptor cells (Wallimann et al., 1986; Hemmer et al., 1993). Creatine kinase may play an important role in photo-transduction by providing energy for the visual cycle (Hemmer et al., 1993). As it is exclusively expressed in photoreceptors and not in any other retinal neurons, it can thus be considered as a novel specific marker of this cell type. *Xenopus calbindin 1* gene, which encodes a calcium binding protein, is also specifically expressed in photoreceptors, confirming previous immunohistochemistry data (Chang and Harris, 1998 and our unpublished data). This contrasts strikingly with its behavior in mammals, where it is used as a horizontal cell marker (Peichl and Gonzalez-Soriano, 1993). Such a non-conserved expression profile between vertebrates is rare, but should be kept in mind whenever genes from our screen are selected for use as retinal cell type markers in other organisms.

We also isolated many genes displaying various bimodal expression patterns: in two different nuclear layers for instance, or in both a nuclear layer and the CMZ (Supporting Information Fig. 1). In addition, some probes were found to label the inner and/or outer plexiform layers, suggesting an unusual cellular sub-localization of the RNA in the dendrites or the axons of retinal neurons (data not shown).

Whole CMZ and Progenitor Markers Retrieved from the Screen

Regarding genes expressed in the whole CMZ, our results showed that the staining could be ranked in two categories: sharp or fuzzy. We assume that the former is true CMZ specific expression, with clear staining and sharp boundaries [Fig. 2(A)], whilst the latter suggests a gradient of expression that goes beyond the CMZ towards the central retina [Fig. 2(A′)]. In the fuzzy cases, we also noted that the staining tends to extend into the epidermis surrounding the retina. Such an expression pattern may thus reflect ubiquitous rather than CMZ-specific expression. In line with this idea, such a profile was frequently seen with probes against genes encoding ribosomal proteins (data not shown), which we presume to be ubiquitously expressed. For this reason, we thus scored as CMZ markers only genes exhibiting sharp expression boundaries (15 genes; Fig. 2).

Many genes previously described in the literature as being involved in retinal cell fate decision display a restricted expression pattern in the central CMZ, where progenitor cells reside. Notably, most of these encode transcription factors (reviewed in Henningfeld et al., 2007). Interestingly, the six genes that we retrieved in the present screen as being exclusively expressed in the central CMZ are not transcription factors and represent potential candidates for involve-

ment in retinal cell proliferation/determination. In particular, some of these markers, such as *cd82*, may be key regulators of the signaling pathways at work in progenitor cells. *cd82* encodes a tetraspanin membrane protein that can function as a suppressor of tumor metastasis (Tonoli and Barrett, 2005). It has recently been shown to suppress canonical Wnt signaling activity *in vitro* and to induce a significant decrease in β-catenin protein levels (Chairoungdua et al., 2010). The *cd82* gene was also shown to be upregulated after retinal injury in rat (Vazquez-Chona et al., 2004), but its role in this context and during retinal development has not been investigated yet.

Identification of Specific Retinal Stem Cell Markers

Our main objective in this work was to uncover novel specific markers of retinal stem cells. Several lines of evidence locate these cells at the tip of the CMZ (Wetts et al., 1989; Perron et al., 1998). Beside their multipotency, which was determined over 25 years ago (Wetts et al., 1989), two other stemness features of these peripheral cells were recently demonstrated: slow dividing properties and self-renewal abilities (Xue and Harris, 2012). Some genes were previously reported as being expressed in these cells but not exclusively. This is the case of *pax6*, *rax (Rx)*, or *six6 (Optx2)*, which all label the whole CMZ and some differentiated neurons (Perron et al., 1998). Genes displaying an expression pattern tightly restricted to the tip of the CMZ, such as *gli3* (Perron et al., 2003), have rarely been described so far. Here we found 18 genes for which expression was restricted to the peripheral CMZ region and excluded from its central part [Fig. 3(A–R) and Table 1]. We therefore categorized them as retinal stem cell markers. Retrieval of the tissue non-specific alkaline phosphatase gene [Fig. 3(A)], a marker of embryonic stem cells, constitutes a good proof of principle for our screening strategy. This is also consistent with the recent finding that this enzyme is enriched in neural precursor cells of the adult mouse brain and important for neural stem cell proliferation and differentiation *in vitro* (Kermer et al., 2010). Moreover, four of our retinal stem cell markers, nop58, kpnb1, aurka and zmcm3, belong to the previously established protein-protein network PluriNet, a network associated with stem cell pluripotency (Müller et al., 2008).

Notably, although expression domains of the 18 genes encompassed the stem cell containing region, their expansion differed significantly from one to another. This was quantified by measuring the extent of each staining relative to the total CMZ area. We found values ranging from less than 25% to approximately 50% of the CMZ [Fig. 3(S)]. Based on the previously described subdivisions of the *Xenopus* CMZ (Perron et al., 1998; Ohnuma et al., 2002), it is thus likely that genes displaying the largest expression domains are expressed in both stem cells and young progenitors. In addition, we cannot exclude the possibility that the retrieved markers label distinct retinal stem cell subpopulations. Accumulating evidences point to a great heterogeneity of adult neural stem cells in the brain (Alvarez-Buylla et al., 2008), and whether this holds true in the CMZ remains to be investigated.

Beyond their common expression in the stem cell zone of the CMZ, we also noted that the identified markers labeled lens epithelial cells as well (Fig. 3). In addition, most of candidates displayed a strikingly similar expression profile in whole embryos, strongly suggesting that they represent members of the same synexpression group (Fig. 4). All of them, except *sulfatase 2* [Fig. 4(B)], labeled the branchial arches. This may however reflect some background expression given the known tendency of this region to pick up unspecific staining. More interestingly, in addition to the eye, the brain was systematically stained, suggesting that the retrieved genes may be general neural stem cell markers. Importantly, most of them are mainly expressed in a stripe at the midbrain–hindbrain boundary (MHB). The MHB contains the isthmic organizer, a critical signaling center that controls both patterning and growth of this region of the brain. In particular, a group of Hes factors, including Her9, which is closely related to Hes4, one of our retinal stem cell specific candidates [Fig. 4(F) and see below], have been shown in zebrafish to have crucial functions in the maintenance of the progenitor pool in this zone (Geling et al., 2003; Ninkovic et al., 2008; Stigloher et al., 2008). It is therefore tempting to speculate that some of the novel markers identified in the screen and expressed in this region might also participate in this process. Finally, a staining was also often detected in the tailbud. The tip of the young tadpole tail contains distinct proliferative cell populations consisting of undifferentiated mesodermal and ectodermal cells, which allow for continuous growth of the tail during the larval stages, but will eventually differentiate into neural tube, notochord, and segmented somites (Gont et al., 1993). The tailbud has the striking ability to regenerate the original tail when isolated in culture (Deuchar, 1975). It should therefore not be surprising to find neural stem cell markers in this region.

Gene Ontology Analysis of Retinal Stem Cell Markers Retrieved from the Screen

GO classification of our markers revealed a variety of associated cellular components, biological processes,

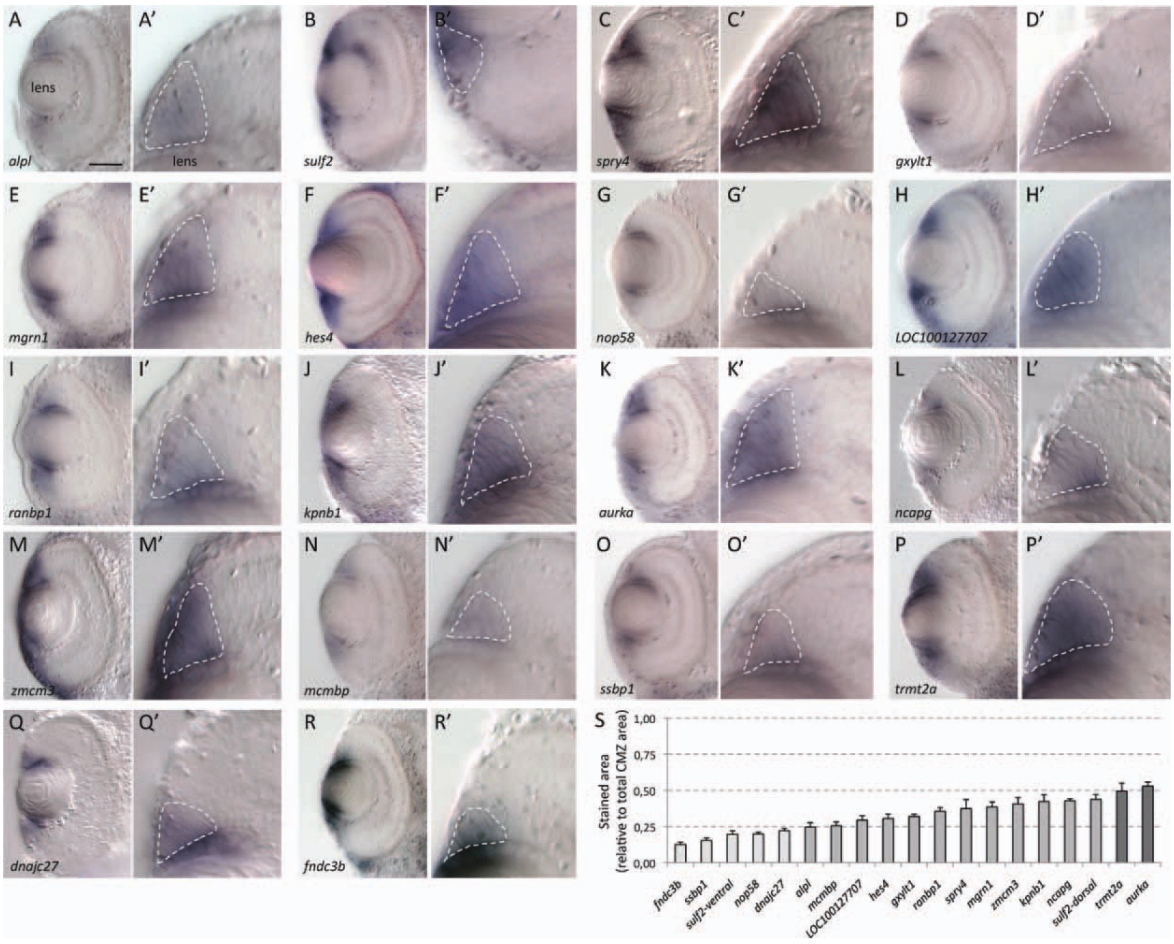


Figure 3 Novel retinal stem cell markers retrieved from the screen. A–R: Stage 39 retinal sections showing the specific expression in retinal stem cells of the 18 clones isolated from the screen (gene symbol is indicated on each panel). A′–R′: Magnification of the corresponding dorsal CMZ (except for *sulf2* in (B–B′) for which the ventral CMZ is shown). White doted lines delineate the staining. S: Quantification of the staining extent in the dorsal CMZ. Values represent the stained surface relative to total CMZ area and are given as mean ± SEM (n = at least 6 retinal sections per clone). Note that although all clones are expressed in the stem cell containing region of the CMZ, staining expansion differs from one to another (light grey: less than 25% of the CMZ area; medium grey: between 25 and 45%; dark grey: more than 45%). In addition, major dorso-ventral variability is observed for *sulf2*, which was thus quantified in both the dorsal and ventral CMZ as indicated. Scale bar = 50 μm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

and molecular functions (Fig. 5). Four potential regulators of signal transduction whose role in the retina has not been addressed yet were found [Fig. 3(B–E)]. These include sulfatase 2 [sulf2; Fig. 3(B)], a member of the heparin-degrading endosulfatases, and sprouty homolog 4-like [spry4; Fig. 3(C)], which belongs to the sprouty family of receptor tyrosine kinase inhibitors. Both are known to exert an inhibitory effect on the fibroblast growth factor signaling pathway (Mason et al., 2004; Rosen and Lemjabbar-Alaoui, 2010). Intriguingly, *sulf2* expression displays a clear dorso-ventral asymmetry, being restricted ventrally to the stem cell zone, while exhibiting a more diffuse dorsal expression, spreading into the ganglion cell layer [Fig. 3(B,S)]. The third potential regulator of signal transduction encodes the glucoside xylosyltransferase 1 [gxylt1; Fig. 3(D)], a member of the glycosyltransferase 8 family. Interestingly, this enzyme was recently reported to participate in extensive glycosylation of the Notch receptor (Sethi et al., 2010). Although the functional impact of such modifications is far from being understood, glycosylations catalyzed by the enzymes Fringe and Rumi have been shown to play key roles in Notch signaling modulation (Haines and

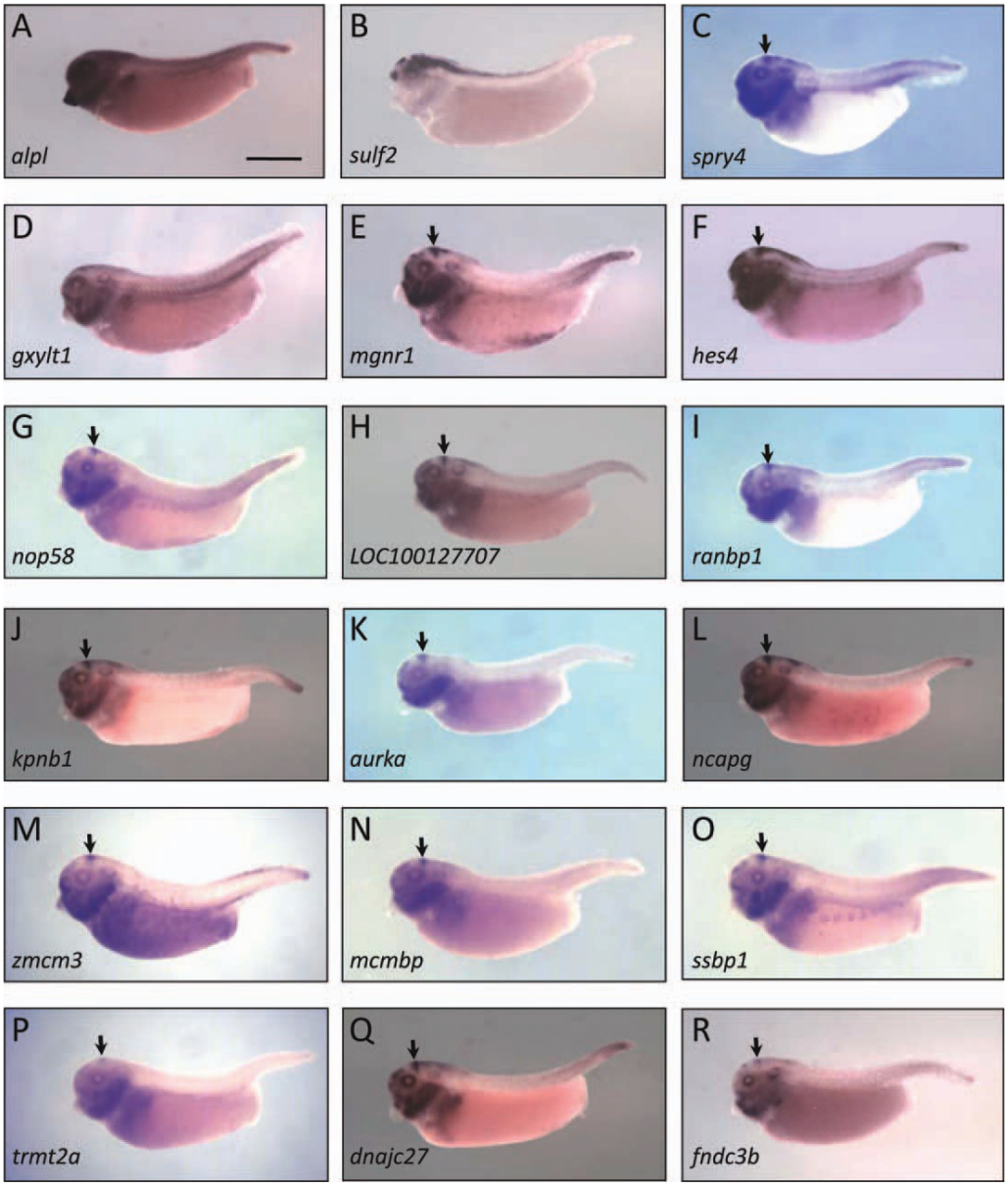


Figure 4 Expression of novel retinal stem cell markers in whole tadpoles. Whole mount expression patterns on stage 39 tadpoles of the 18 retinal stem cell markers. Most clones exhibit a strikingly similar expression profile, strongly suggesting that they form a synexpression group. In particular, in addition to the eye, selected clones label the midbrain–hindbrain boundary (arrows). The tip of the tail is also stained in most of these pictures. Gene symbol is indicated on each panel. Scale bar = 500 μm. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Irvine, 2003; Acar et al., 2008; Fernandez-Valdivia et al., 2011). Relationships of gxylt1 with Notch signaling may thus be an interesting lead to follow to uncover its involvement in retinal stem cells. Finally, we also isolated *mahogunin ring finger-1* [*mgrn1*; Fig. 3(E)], which encodes a C3HC4 RING domain-containing protein with ubiquitin ligase activity (He et al., 2003). *mgrn1*-null mutant mice have a pleiotropic phenotype but defects in neural stem cell activity have not been described so far. Of note, this protein has been proposed to be a crucial actor of endosome-to-lysosome trafficking (Kim et al., 2007) and might as such be involved in the regulation of the potency and duration of intracellular signaling within the retinal stem cell niche.

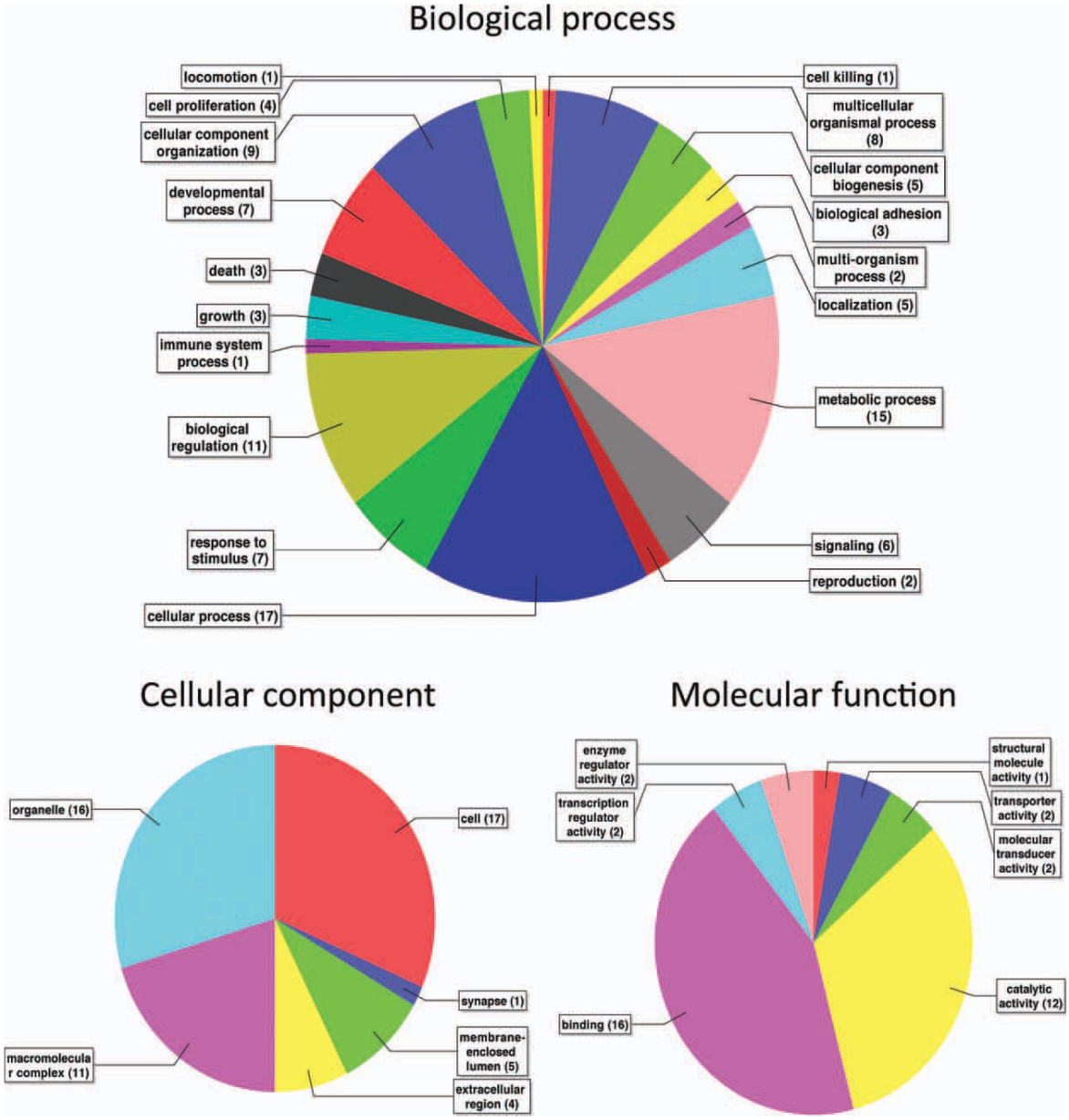


Figure 5 Combined graph of GO annotation for the 18 retinal stem cell markers retrieved from the screen. These pie charts depict the results of a GO annotation made on the 18 retinal stem cell markers using the biological process, the molecular function or the cellular component thesaurus. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Three factors potentially involved in gene expression regulation were isolated [Fig. 3(F–H)]. Among them is the transcriptional repressor hes4 [Fig. 3(F)], which we previously and independently identified as being specifically expressed in the stem cell containing region of the *Xenopus* retina. A great number of studies show Hes family members to act as essential regulators of neural stem cell activity in the brain (reviewed in Kageyama et al., 2008). In line with this, hes4 seems to play a crucial role in retinal stem cells by keeping them in a proliferative and undifferentiated state during retinogenesis (our unpublished data). The two other identified factors in this gene expression category are potential post-transcriptional regulators: an RNA binding protein, the snoRNP-associated protein NOP58 [Fig. 3(G)], and a hypo-

thetical non-coding RNA [misc RNA, Fig. 3(H)]. The function of these genes in neural stem cells remain to be investigated.

We also pulled out four molecules known to be involved in diverse processes associated with cell cycle [Fig. 3(I–L)]. Surprisingly, three of them, namely RAN binding protein 1 [ranbp1; Fig. 3(I)], karyopherin (importin) β 1 [kpnb1; Fig. 3(J)], and the mitotic regulator aurora kinase A [aurka; Fig. 3(K)] are direct or indirect effectors of the Ran GTPase (Avis and Clarke, 1996; Ciciarello et al., 2004; Ding et al., 2011). The Ran network is known to act in nucleocytoplasmic transport and during mitosis to regulate spindle assembly and cell cycle progression (reviewed in Clarke and Zhang, 2008). In addition, Ran has also been involved in asymmetric division of the vertebrate oocyte by controlling spindle organization and positioning (Deng et al., 2007; reviewed in Verlhac and Dumont, 2008). This is of particular interest in the field of neural stem cells, as recent studies have unveiled the key contribution of spindle orientation in stem cell self-renewing asymmetric division (Lesage et al., 2010). Whether the Ran network may serve such a function in retinal stem cells is however unknown. The fourth factor belonging to the cell cycle GO group is the non-SMC condensin I complex, subunit G [ncapg; Fig. 3(L)]. ncapg, which regulates chromosome condensation and segregation during mitosis, has previously been described as specifically expressed in the zebrafish CMZ (Seipold et al., 2009). Interestingly, its loss of function was reported to cause increased rates of apoptosis among CMZ cells, probably due to chromosomal non-disjunction and consequent tetraploidization (Seipold et al., 2009).

Belonging to the GO group of nucleic acid metabolic process, we found two factors associated with the minichromosome maintenance complex (MCM): the zygotic DNA replication licensing factor mcm3 [zmcm3; Fig. 3(M)] and the MCM binding protein [mcmbp; Fig. 3(N)]. Interestingly, a mutation in MCM3 results in reduced CMZ in the fish retina (Gross et al., 2005). MCM is a group of highly conserved proteins essential for the initiation of DNA replication. In addition, it has also been implicated in the maintenance of genomic integrity as a platform for multiple DNA damage-dependent regulatory signals (Forsburg, 2004). Our finding that two factors associated with the MCM are strongly expressed in the retinal stem cell compartment is particularly interesting considering that stem cells must employ particular mechanisms to prevent the propagation of mutations (Tichy, 2011). In line with this, we identified in the same GO group the single-stranded DNA binding protein 1 [ssbp1; Fig. 3(O)] and TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog A [trmt2a; Fig. 3(P)], which have also been shown to play important roles in DNA damage responses (Choudhury et al., 2007; Richard et al., 2008).

Belonging to the GO group of protein metabolic process, we found DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27 [dnajc27; Fig. 3(Q)]. Hsp proteins are involved in protein folding and typically associated with stress response. Such an enrichment of *dnajc27* in retinal stem cells is consistent with the discovery that embryonic stem cells exhibit enhanced stress tolerance and high levels of chaperone expression (Prinsloo et al., 2009). Interestingly too, the *mammalian relative of DnaJ* (*Mrj*) appears to be required for neural stem cell self-renewal (Watson et al., 2009).

Finally, a last promising marker discovered from the screen is a molecule potentially involved in cell adhesion within the stem cell niche, the fibronectin type III domain-containing protein 3B-like [fndc3b; Fig. 3(R)].

XenMARK Annotation

To retrieve markers gathered from our screen in a straightforward and powerful way, we took advantage of the existing Web-based annotation tool, XenMARK (http://genomics.nimr.mrc.ac.uk/apps/XenMARK/). XenMARK is a database for *Xenopus* gene expression patterns that allows the formulation of queries by specific location or region in the embryo through direct mark-up on schematic diagrams (Gilchrist et al., 2009). We thus designed a novel module in XenMARK, allowing manual annotation on a retinal section diagram depicting the nine compartments described above (Fig. 2). We also annotated all our whole mount pictures in order to associate them with the retinal expression patterns, and to make them available to the whole community. For each clone, three images of whole mount specimens and three of the corresponding retinal sections (when the eye was labeled) were uploaded to the database, making a total of 4672 images: 3243 of whole mount and 1429 of retinal sections. As previously described (Gilchrist et al., 2009), one image per clone tested was chosen for annotation, whilst the others were marked as duplicates. The annotator could chose to describe each expression pattern as ubiquitous, no expression, indistinct, or to manually annotate it on the corresponding diagram. Figure 6 illustrates the annotation procedure on whole embryos or on retinal sections. Among the whole mount *in situ* hybridization pictures, 292 were classified as ubiquitous, 180 as no expression, 117 as indistinct, 2130 as duplicates, and 524 were annotated with specific expression patterns. Among the retinal section pictures, 6 were classified

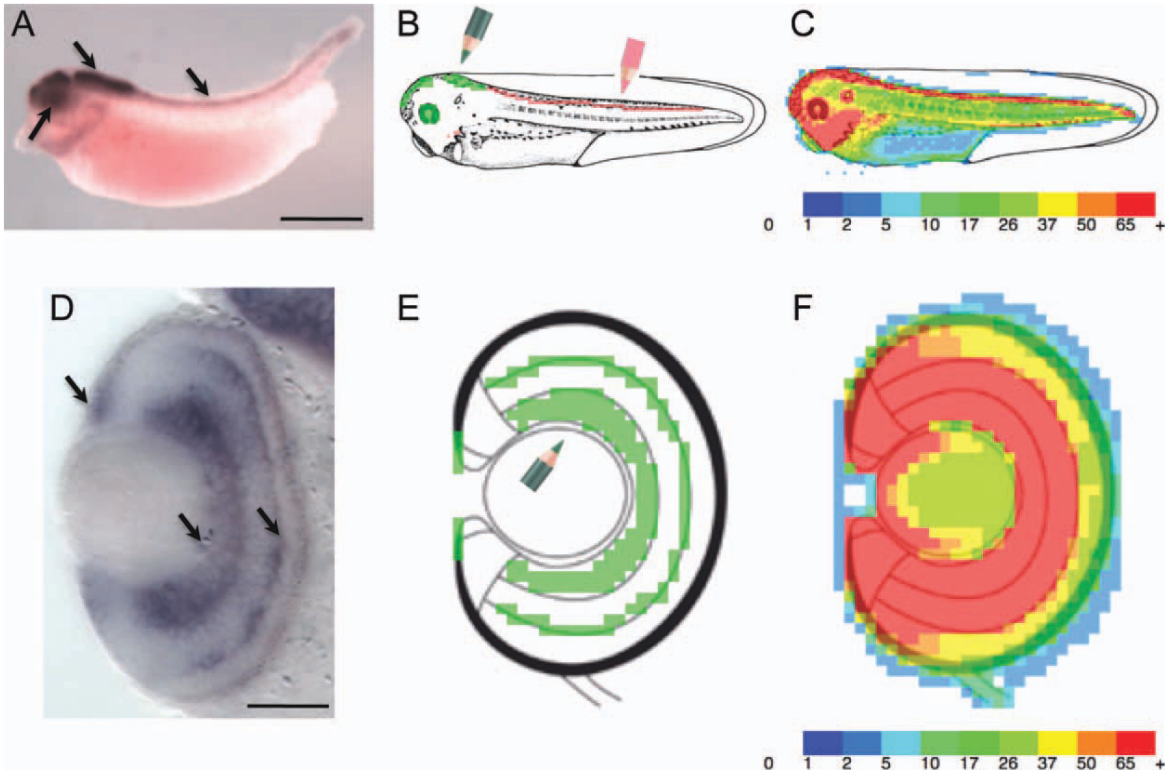


Figure 6 XenMARK annotation of *in situ* hybridization patterns from both whole tadpoles and retinal sections. Illustration of the annotation process of whole mount (A,B) or retinal (D,E) expression patterns using the XenMARK bioinformatic tool. The procedure consists in manually transferring the expression profiles observed on original images to schematic diagrams, by direct mark-up of selected zones. Intensity of the staining can be distinguished. In (B) for instance, strong expression in the brain and eye is drawn in green, while faint expression in the spinal cord is in red. D,E: Show an example of a complex retinal expression pattern (D), where three sites of expression (arrows) have been drawn to the schematic (green in E). C,F: The full set of annotations is superimposed on heatmap diagrams, revealing the lowest to densest caches of data. Heatmap color scales reflect numbers of annotated images at each pixel. Of note, pixels outside the retina schematic correspond to the corneal epithelium on one hand, and the periocular mesenchym on the other hand, where a couple of clones were expressed. Scale bar = 500 μm (A) or 50 μm (D). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

as ubiquitous, 12 as no expression, 96 as indistinct, 944 as duplicates, and 371 were annotated.

Fuelling the Database with Known Retinal Markers

To make this novel collection of retinal markers the largest possible, we decided to fuel the XenMARK database with *in situ* image annotations of already known *Xenopus* markers. From the literature, we picked genes for which retinal expression profiles were available on sections of either *Xenopus laevis* or *Xenopus tropicalis* tadpoles. To widen our set of genes, we retained images from embryos ranging from stage 34 to stage 54. All were annotated on the same retinal section diagram since the general architecture of the retina does not vary much during this period. For two markers, however, two developmental stages were selected because of important qualitative differences in labeling distribution. Although not exhaustive, as many as 202 markers could be added this way, comprising a total of 173 images annotated as having restricted staining. Due to copyright issues, access to most of these images requires the user to go through a PudMed link directed to the manuscript of origin, except for the 54 of them which correspond to our own unpublished retinal images.

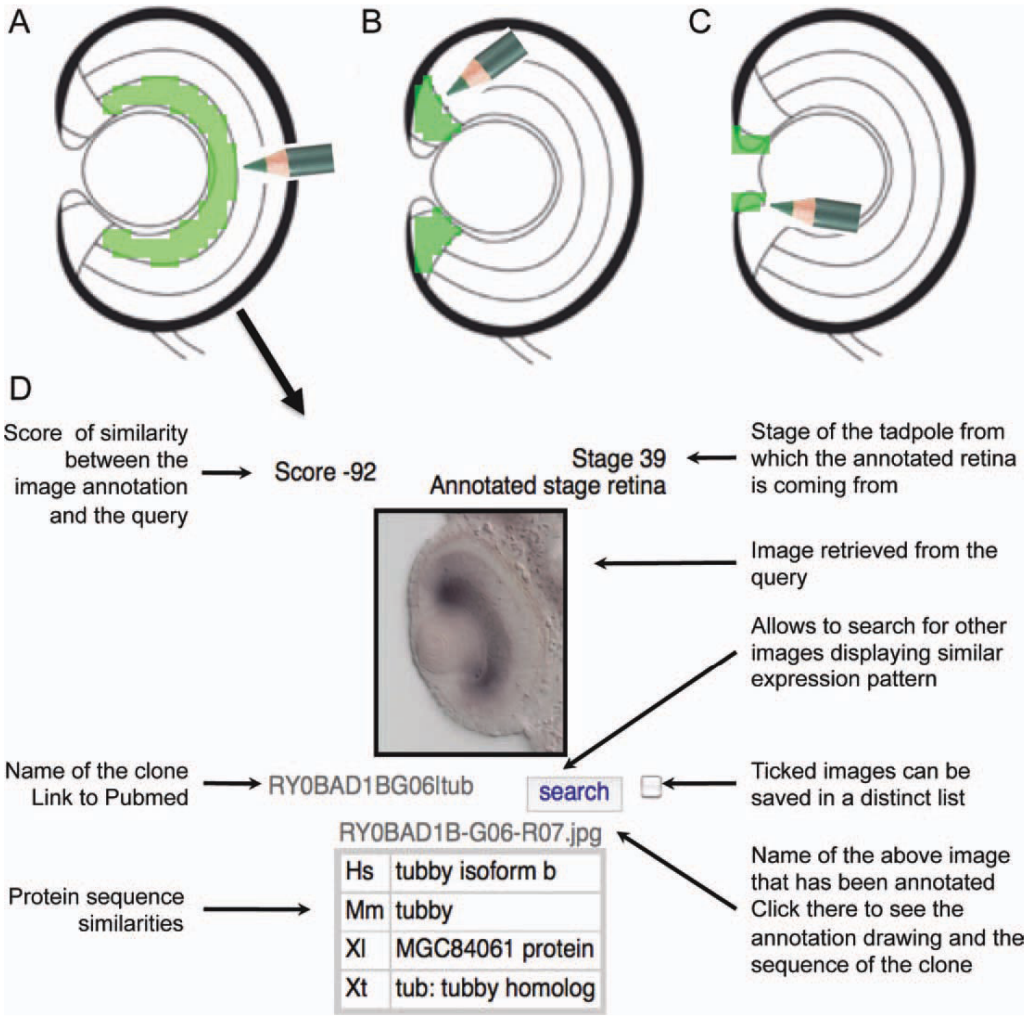


Figure 7 Retrieving retinal markers of interest from the XenMARK database. Using the "Search by expression tool," one can mark-up the area of interest on the retinal section diagram, such as the ganglion cell layer (A), the progenitor cell region (B), or the stem cell containing area (C). Results of the query are subsequently displayed as a list of images fulfilling the requested expression pattern. D: Illustrates one image retrieved following a query as in (A). The various details provided on the image, the clone name and the corresponding sequence are indicated. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Retrieval of Retinal Markers from the XenMARK Database

As a whole, we collected and annotated 544 images of expression pattern on retinal sections, gathered from our screen (371) or from the literature (173). To retrieve markers, the "search by expression" tool should be used to mark-up the zone of interest on the schematic of the retina. Figure 7 depicts example queries along with one typical image retrieved from the search. To assess the accuracy of the retrieval tool, we verified that known markers sorted out as expected. For instance, images of many bHLH transcription factors known to be expressed in the central CMZ (such as *ash3*, *atoh7*, *ptf1a*, *foxN4*, *neurog2*, *ascl1*, *hey1 (hrt1)*, or *hes2;* reviewed in Henningfeld et al., 2007) showed up following the mark-up of this zone. This validates the use of the database to retrieve specific retinal markers from our screen.

Importantly, when the progenitor cell-containing region was marked-up, and the query limited to the 12 first images, 11 corresponded to those gathered from the literature and only one from our screen. In contrast, when the stem cell zone of the CMZ was selected as query, we obtained the inverse situation: only one

image out of 12 was from the literature, while 11 were from our screen. This clearly highlights the success of our screen in providing a significant advance in our knowledge of retinal stem cell molecular signature.

Beside this immediate benefit, a future challenge will be to keep this collection alive and growing by constantly updating the XenMARK database upon discovery of novel retinal markers by the whole *Xenopus* community. Additionally, we believe that this work represents a useful proof of principle of the versatility of the XenMARK system. Hopefully, this bioinformatic tool will support further developments and will be customized to gather cell type specific markers of other organs using this sectional approach.

Authors are grateful to C. de Meideros for animal care.

REFERENCES

Acar M, Jafar-Nejad H, Takeuchi H, Rajan A, Ibrani D, Rana NA, Pan H, et al. 2008. Rumi is a CAP10 domain glycosyltransferase that modifies Notch and is required for Notch signaling. Cell 132:247–258.

Ahmad I, Tang L, Pham H. 2000. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. Biochem Biophys Res Commun 270:517–521.

Alvarez-Buylla A, Kohwi M, Nguyen TM, Merkle FT. 2008. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 73:357–365.

Avis JM, Clarke PR. 1996. Ran, a GTPase involved in nuclear processes: Its regulators and effectors. J Cell Sci 109 (Part 10):2423–2427.

Bhatia B, Singhal S, Lawrence JM, Khaw PT, Limb GA. 2009. Distribution of Muller stem cells within the neural retina: Evidence for the existence of a ciliary margin-like zone in the adult human eye. Exp Eye Res 89:373–382.

Broadbent J, Read EM. 1999. Wholemount *in situ* hybridization of *Xenopus* and zebrafish embryos. Methods Mol Biol 127:57–67.

Casarosa S, Leone P, Cannata S, Santini F, Pinchera A, Barsacchi G, Andreazzoli M. 2005. Genetic analysis of metamorphic and premetamorphic *Xenopus* ciliary marginal zone. Dev Dyn 233:646–651.

Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. 2010. Exosome release of β-catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. J Cell Biol 190:1079–1091.

Chang WS, Harris WA. 1998. Sequential genesis and determination of cone and rod photoreceptors in *Xenopus*. J Neurobiol 35:227–244.

Choudhury SA, Asefa B, Kauler P, Chow TY. 2007. Synergistic effect of TRM2/RNC1 and EXO1 in DNA double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biochem 304:127–134.

Cicero SA, Johnson D, Reyntjens S, Frase S, Connell S, Chow LM, Baker SJ, et al. 2009. Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. Proc Natl Acad Sci USA 106:6685–6690.

Ciciarello M, Mangiacasale R, Thibier C, Guarguaglini G, Marchetti E, Di Fiore B, Lavia P. 2004. Importin β is transported to spindle poles during mitosis and regulates Ran-dependent spindle assembly factors in mammalian cells. J Cell Sci 117:6511–6522.

Clarke PR, Zhang C. 2008. Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase. Nat Rev Mol Cell Biol 9:464–477.

Coles BL, Angenieux B, Inoue T, Del Rio-Tsonis K, Spence JR, McInnes RR, Arsenijevic Y, et al. 2004. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 101:15772–15777.

Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. 2005. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. Bioinformatics 21:3674–3676.

Deng M, Suraneni P, Schultz RM, Li R. 2007. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. Dev Cell 12:301–308.

Deuchar EM. 1975. Regeneration of the tail bud in Xenopus embryos. J Exp Zool 192:381–390.

Ding J, Swain JE, Smith GD. 2011. Aurora kinase-A regulates microtubule organizing center (MTOC) localization, chromosome dynamics, and histone-H3 phosphorylation in mouse oocytes. Mol Reprod Dev 78:80–90.

Endo M, Ohashi K, Mizuno K. 2007. LIM kinase and slingshot are critical for neurite extension. J Biol Chem 282:13692–13702.

Fernandez-Valdivia R, Takeuchi H, Samarghandi A, Lopez M, Leonardi J, Haltiwanger RS, Jafar-Nejad H. 2011. Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein *O*-glucosyltransferase Rumi. Development 138:1925–1934.

Fierro AC, Thuret R, Coen L, Perron M, Demeneix BA, Wegnez M, Gyapay G, et al. 2007. Exploring nervous system transcriptomes during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus* tropicalis using EST analysis. BMC Genomics 8:118.

Fischer AJ, Reh TA. 2000. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. Dev Biol 220:197–210.

Forsburg SL. 2004. Eukaryotic MCM proteins: Beyond replication initiation. Microbiol Mol Biol Rev 68:109–131.

Fujisawa H, Takagi S, Hirata T. 1995. Growth-associated expression of a membrane protein, neuropilin, in *Xenopus* optic nerve fibers. Dev Neurosci 17:343–349.

Geling A, Itoh M, Tallafuss A, Chapouton P, Tannhauser B, Kuwada JY, Chitnis AB, et al. 2003. bHLH transcription factor Her5 links patterning to regional inhibition of neurogenesis at the midbrain-hindbrain boundary. Development 130:1591–1604.

Gilchrist MJ, Christensen MB, Bronchain O, Brunet F, Chesneau A, Fenger U, Geach TJ, et al. 2009. Database

of queryable gene expression patterns for *Xenopus*. Dev Dyn 238:1379–1388.

Gont LK, Steinbeisser H, Blumberg B, de Robertis EM. 1993. Tail formation as a continuation of gastrulation: The multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip. Development 119:991–1004.

Gross JM, Perkins BD, Amsterdam A, Egaña A, Darland T, Matsui JI, Sciascia S, et al. 2005. Identification of zebrafish insertional mutants with defects in visual system development and function. Genetics 170:245–261.

Haines N, Irvine KD. 2003. Glycosylation regulates Notch signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 4:786–797.

Harland RM. 1991. *In situ* hybridization: an improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. Methods Cell Biol 36:685–695.

He L, Eldridge AG, Jackson PK, Gunn TM, Barsh GS. 2003. Accessory proteins for melanocortin signaling: Attractin and mahogunin. Ann NY Acad Sci 994:288–298.

Hemmer W, Riesinger I, Wallimann T, Eppenberger HM, Quest AF. 1993. Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: Role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction. J Cell Sci 106 (Part 2):671–683.

Henningfeld KA, Locker M, Perron M. 2007. *Xenopus* primary neurogenesis and retinogenesis. Funct Dev Embryol 1:26–36.

Ikeda S, Ikeda A, Naggert JK, Nishina PM. 2003. Towards understanding the function of the tubby gene family in the retina. Adv Exp Med Biol 533:309–314.

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

Keefe JR. 1973. An analysis of urodelian retinal regeneration. I. Studies of the cellular source of retinal regeneration in Notophthalmus viridescens utilizing 3 *H*-thymidine and colchicine. J Exp Zool 184:185–206.

Kermer V, Ritter M, Albuquerque B, Leib C, Stanke M, Zimmermann H. 2010. Knockdown of tissue nonspecific alkaline phosphatase impairs neural stem cell proliferation and differentiation. Neurosci Lett 485:208–211.

Kim BY, Olzmann JA, Barsh GS, Chin LS, Li L. 2007. Spongiform neurodegeneration-associated E3 ligase Mahogunin ubiquitylates TSG101 and regulates endosomal trafficking. Mol Biol Cell 18:1129–1142.

Kubota R, Hokoc JN, Moshiri A, McGuire C, Reh TA. 2002. A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. Brain Res Dev Brain Res 134:31–41.

Lesage B, Gutierrez I, Marti E, Gonzalez C. 2010. Neural stem cells: The need for a proper orientation. Curr Opin Genet Dev 20:438–442.

Locker M, El Yakoubi W, Mazurier N, Dullin JP, Perron M. 2010. A decade of mammalian retinal stem cell research. Arch Ital Biol 148:59–72.

MacNeil A, Pearson RA, MacLaren RE, Smith AJ, Sowden JC, Ali RR. 2007. Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. Stem Cells 25:2430–2438.

Mason JM, Morrison DJ, Bassit B, Dimri M, Band H, Licht JD, Gross I. 2004. Tyrosine phosphorylation of Sprouty proteins regulates their ability to inhibit growth factor signaling: A dual feedback loop. Mol Biol Cell 15:2176–2188.

Müller FJ, Laurent LC, Kostka D, Ulitsky I, Williams R, Lu C, Park IH, et al. 2008. Regulatory networks define phenotypic classes of human stem cell lines. Nature 455:401–405.

Ninkovic J, Stigloher C, Lillesaar C, Bally-Cuif L. 2008. Gsk3β/PKA and Gli1 regulate the maintenance of neural progenitors at the midbrain-hindbrain boundary in concert with E(Spl) factor activity. Development 135:3137–3148.

Ohnuma S, Hopper S, Wang KC, Philpott A, Harris WA. 2002. Co-ordinating retinal histogenesis: Early cell cycle exit enhances early cell fate determination in the *Xenopus* retina. Development 129:2435–2446.

Peichl L, Gonzalez-Soriano J. 1993. Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the mammalian retina. J Neurosci 13:4091–4100.

Perron M, Boy S, Amato MA, Viczian A, Koebernick K, Pieler T, Harris WA. 2003. A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. Development 130:1565–1577.

Perron M, Kanekar S, Vetter ML, Harris WA. 1998. The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. Dev Biol 199:185–200.

Pollet N, Muncke N, Verbeek B, Li Y, Fenger U, Delius H, Niehrs C. 2005. An atlas of differential gene expression during early *Xenopus* embryogenesis. Mech Dev 122:365–439.

Pollet N, Niehrs C. 2001. Expression profiling by systematic high-throughput *in situ* hybridization to whole-mount embryos. Methods Mol Biol 175:309–321.

Prinsloo E, Setati MM, Longshaw VM, Blatch GL. 2009. Chaperoning stem cells: A role for heat shock proteins in the modulation of stem cell self-renewal and differentiation? Bioessays 31:370–377.

Richard DJ, Bolderson E, Cubeddu L, Wadsworth RI, Savage K, Sharma GG, Nicolette ML. 2008. Single-stranded DNA-binding protein hSSB1 is critical for genomic stability. Nature 453:677–681.

Rosen SD, Lemjabbar-Alaoui H. 2010. Sulf-2: An extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. Expert Opin Ther Targets 14:935–949.

Seipold S, Priller FC, Goldsmith P, Harris WA, Baier H, Abdelilah-Seyfried S. 2009. Non-SMC condensin I complex proteins control chromosome segregation and survival of proliferating cells in the zebrafish neural retina. BMC Dev Biol 9:40.

Sethi MK, Buettner FF, Krylov VB, Takeuchi H, Nifantiev NE, Haltiwanger RS, Gerardy-Schahn R, et al. 2010. Identification of glycosyltransferase 8 family members as xylosyltransferases acting on O-glucosylated notch epidermal growth factor repeats. J Biol Chem 285:1582–1586.

Stigloher C, Chapouton P, Adolf B, Bally-Cuif L. 2008. Identification of neural progenitor pools by E(Spl) factors in the embryonic and adult brain. Brain Res Bull 75:266–273.

Tichy ED. 2011. Mechanisms maintaining genomic integrity in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Exp Biol Med (Maywood) 236:987–996.

Tonoli H, Barrett JC. 2005. CD82 metastasis suppressor gene: A potential target for new therapeutics? Trends Mol Med 11:563–570.

Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D. 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science 287:2032–2036.

Vazquez-Chona F, Song BK, Geisert EE Jr. 2004. Temporal changes in gene expression after injury in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 45:2737–2746.

Verlhac MH, Dumont J. 2008. Interactions between chromosomes, microfilaments and microtubules revealed by the study of small GTPases in a big cell, the vertebrate oocyte. Mol Cell Endocrinol 282:12–17.

Wallimann T, Wegmann G, Moser H, Huber R, Eppenberger HM. 1986. High content of creatine kinase in chicken retina: Compartmentalized localization of creatine kinase isoenzymes in photoreceptor cells. Proc Natl Acad Sci USA 83:3816–3819.

Watson ED, Mattar P, Schuurmans C, Cross JC. 2009. Neural stem cell self-renewal requires the Mrj co-chaperone. Dev Dyn 238:2564–2574.

Wen Z, Han L, Bamburg JR, Shim S, Ming GL, Zheng JQ. 2007. BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. J Cell Biol 178:107–119.

Wetts R, Serbedzija GN, Fraser SE. 1989. Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. Dev Biol 136:254–263.

Xi Q, Pauer GJ, Traboulsi EI, Hagstrom SA. 2006. Mutation screen of the TUB gene in patients with retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis. Exp Eye Res 83:569–573.

Xue XY, Harris WA. 2012. Using *myc* genes to search for stem cells in the ciliary margin of the *Xenopus* retina. Dev Neurobiol 72:475–490.

Yoshii C, Ueda Y, Okamoto M, Araki M. 2007. Neural retinal regeneration in the anuran amphibian *Xenopus laevis* post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina. Dev Biol 303:45–56.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abdouh, M., & Bernier, G. (2006). In vivo reactivation of a quiescent cell population located in the ocular ciliary body of adult mammals. *Experimental Eye Research*, *83*(1), 153–64. doi:10.1016/j.exer.2005.11.016

Ahmad, I., Das, A. V, James, J., Bhattacharya, S., & Zhao, X. (2004). Neural stem cells in the mammalian eye: types and regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *15*(1), 53–62. doi:10.1016/j.semcdb.2003.09.003

Ahmad, I., Tang, L., & Pham, H. (2000). Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *270*(2), 517–21. doi:10.1006/bbrc.2000.2473

Akagi, T., Mandai, M., Ooto, S., Hirami, Y., Osakada, F., Kageyama, R., … Takahashi, M. (2004). Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *45*(12), 4570–5. doi:10.1167/iovs.04-0697

Aladjem, M. I. (2007). Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. *Nature Reviews. Genetics*, *8*(8), 588–600. doi:10.1038/nrg2143

Alarcón, C., Zaromytidou, A.-I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., … Massagué, J. (2009). Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell*, *139*(4), 757–69. doi:10.1016/j.cell.2009.09.035

Alexson T. O., Hitoshi S., Coles B. L., Bernstein A., van der Kooy D. (2006). Notch signaling is required to maintain all neural stem cell populations-irrespective of spatial or temporal niche. *Developmental neuroscience*, 28(1-2), 34-48.

Alvarez-Medina, R., Le Dreau, G., Ros, M., & Martí, E. (2009). Hedgehog activation is required upstream of Wnt signalling to control neural progenitor proliferation. *Development (Cambridge, England)*, *136*(19), 3301–9. doi:10.1242/dev.041772

Alvarez-Medina R., Cayuso J., Okubo T., Takada S., Marti E. (2008). Wnt canonical pathway restricts graded Shh/Gli patterning activity through the regulation of Gli3 expression. *Development*, *135(2)*, 237-47

Anbanandam, A., Albarado, D. C., Nguyen, C. T., Halder, G., Gao, X., & Veeraraghavan, S. (2006). Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(46), 17225–30. doi:10.1073/pnas.0607171103

Angus, L., Moleirinho, S., Herron, L., Sinha, a, Zhang, X., Niestrata, M., … Gunn-Moore, F. J. (2012). Willin/FRMD6 expression activates the Hippo signaling pathway kinases in mammals and antagonizes oncogenic YAP. *Oncogene*, *31*(2), 238–50. doi:10.1038/onc.2011.224

Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., … Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*, *154*(5), 1047–59. doi:10.1016/j.cell.2013.07.042

Arai, Y., Pulvers, J. N., Haffner, C., Schilling, B., Nüsslein, I., Calegari, F., & Huttner, W. B. (2011). Neural stem and progenitor cells shorten S-phase on commitment to neuron production. *Nature Communications*, *2*, 154. doi:10.1038/ncomms1155

Araki, M. (2007). Regeneration of the amphibian retina : Role of tissue interaction and related signaling molecules on RPE transdifferentiation, 109–120. doi:10.1111/j.1440-169x.2007.00911.x

Aruta, C., Giordano, F., De Marzo, A., Comitato, A., Raposo, G., Nandrot, E. F., & Marigo, V. (2011). In vitro differentiation of retinal pigment epithelium from adult retinal stem cells. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *24*(1), 233–40. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00793.x

Asami, M., Sun, G., Yamaguchi, M., & Kosaka, M. (2007). Multipotent cells from mammalian iris pigment epithelium. *Developmental Biology*, *304*(1), 433–46. doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.047

Asaoka, Y., Hata, S., Namae, M., Furutani-Seiki, M., & Nishina, H. (2014). The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PloS One*, *9*(5), e97365. doi:10.1371/journal.pone.0097365

Attardi, L. D., & DePinho, R. A. (2004). Conquering the complexity of p53. *Nature Genetics*, *36*(1), 7–8. doi:10.1038/ng0104-7

Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., … Piccolo, S. (2014). YAP/TAZ Incorporation in the β-Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. *Cell*, *158*(1), 157–70. doi:10.1016/j.cell.2014.06.013

Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., … Piccolo, S. (2012). Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell*, *151*(7), 1443–56. doi:10.1016/j.cell.2012.11.027

B

Badouel, C., Gardano, L., Amin, N., Garg, A., Rosenfeld, R., Le Bihan, T., & McNeill, H. (2009). The FERM-domain protein Expanded regulates Hippo pathway activity via direct interactions with the transcriptional activator Yorkie. *Developmental Cell*, *16*(3), 411–20. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.010

Bai, H., Zhang, N., Xu, Y., Chen, Q., Khan, M., Potter, J. J., … Anders, R. a. (2012). Yes-associated protein regulates the hepatic response after bile duct ligation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *56*(3), 1097–107. doi:10.1002/hep.25769

Ballios, B. G., Clarke, L., Coles, B. L. K., Shoichet, M. S., & Van Der Kooy, D. (2012). The adult retinal stem cell is a rare cell in the ciliary epithelium whose progeny can differentiate into photoreceptors. *Biology Open*, *1*(3), 237–46. doi:10.1242/bio.2012027

Bando, T., Mito, T., Maeda, Y., Nakamura, T., Ito, F., Watanabe, T., … Noji, S. (2009). Regulation of leg size and shape by the Dachsous/Fat signalling pathway during regeneration. *Development (Cambridge, England)*, *136*(13), 2235–45. doi:10.1242/dev.035204

Barrios-Rodiles, M., Brown, K. R., Ozdamar, B., Bose, R., Liu, Z., Donovan, R. S., … Wrana, J. L. (2005). High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells. *Science (New York, N.Y.)*, *307*(5715), 1621–5. doi:10.1126/science.1105776

Barry, E. R., Morikawa, T., Butler, B. L., Shrestha, K., de la Rosa, R., Yan, K. S., … Camargo, F. D. (2013). Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature*, *493*(7430), 106–10. doi:10.1038/nature11693

Baumgartner, R., Poernbacher, I., Buser, N., Hafen, E., & Stocker, H. (2010). The WW domain protein Kibra acts upstream of Hippo in Drosophila. *Developmental Cell*, *18*(2), 309–16. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.013

Belliveau, M. J., & Cepko, C. L. (1999). Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development (Cambridge, England)*, *126*(3), 555–66. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9876184

Benhamouche, S., Curto, M., Saotome, I., Gladden, A. B., Liu, C.-H., Giovannini, M., & McClatchey, A. I. (2010). Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes & Development*, *24*(16), 1718–30. doi:10.1101/gad.1938710

Bennett, F. C., & Harvey, K. F. (2006). Fat cadherin modulates organ size in Drosophila via the Salvador/Warts/Hippo signaling pathway. *Current Biology : CB*, *16*(21), 2101–10. doi:10.1016/j.cub.2006.09.045

Bernardos, R. L., Barthel, L. K., Meyers, J. R., & Raymond, P. a. (2007). Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(26), 7028–40. doi:10.1523/JNEUROSCI.1624-07.2007

Berthelsen, J., Kilstrup-nielsen, C., Blasi, F., Mavilio, F., & Zappavigna, V. (1999). The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH.

Berthelsen, J., Zappavigna, V., Mavilio, F., & Blasi, F. (1998). Prep1, a novel functional partner of Pbx proteins. *The EMBO Journal*, *17*(5), 1423–33. doi:10.1093/emboj/17.5.1423

Bettencourt-Dias, M., Giet, R., Sinka, R., Mazumdar, a, Lock, W. G., Balloux, F., … Glover, D. M. (2004). Genome-wide survey of protein kinases required for cell cycle progression. *Nature*, *432*(7020), 980–7. doi:10.1038/nature03160

Beyer, T. a, Weiss, A., Khomchuk, Y., Huang, K., Ogunjimi, A. a, Varelas, X., & Wrana, J. L. (2013). Switch enhancers interpret TGF-β and Hippo signaling to control cell fate in human embryonic stem cells. *Cell Reports*, *5*(6), 1611–24. doi:10.1016/j.celrep.2013.11.021

Bhatia, B., Singhal, S., Jayaram, H., Khaw, P. T., & Limb, G. A. (2010). Adult retinal stem cells revisited. *The Open Ophthalmology Journal*, *4*, 30–8. doi:10.2174/1874364101004010030

Bhattacharya, S., Das, A., Mallya, K., & Ahmad, I. (2007). Maintenance of retinal stem cells by Abcg2 is regulated by notch signaling. *Journal of Cell Science*, *120*(Pt 15), 2652–62. doi:10.1242/jcs.008417

Boggiano, J. C., & Fehon, R. G. (2012). Growth control by committee: intercellular junctions, cell polarity, and the cytoskeleton regulate Hippo signaling. *Developmental Cell*, *22*(4), 695–702. doi:10.1016/j.devcel.2012.03.013

Bossuyt, W., Chen, C.-L., Chen, Q., Sudol, M., McNeill, H., Pan, D., … Halder, G. (2014). An evolutionary shift in the regulation of the Hippo pathway between mice and flies. *Oncogene*, *33*(10), 1218–28. doi:10.1038/onc.2013.82

Bowman, A. N., van Amerongen, R., Palmer, T. D., & Nusse, R. (2013). Lineage tracing with Axin2 reveals distinct developmental and adult populations of Wnt/β-catenin-responsive neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(18), 7324–9. doi:10.1073/pnas.1305411110

Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., … Reichenbach, A. (2009). Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research*, *28*(6), 423–51. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.07.001

Brodowska, K., Al-Moujahed, A., Marmalidou, A., Meyer Zu Horste, M., Cichy, J., Miller, J. W., … Vavvas, D. G. (2014). The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth in vitro without light activation. *Experimental Eye Research*, *124*, 67–73. doi:10.1016/j.exer.2014.04.011

Büther, K., Plaas, C., Barnekow, A., & Kremerskothen, J. (2004). KIBRA is a novel substrate for protein kinase Czeta. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *317*(3), 703–7. doi:10.1016/j.bbrc.2004.03.107

C

Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R. F., Maitra, A., & Pan, D. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes & Development*, *24*(21), 2383–8. doi:10.1101/gad.1978810

Cai, L., Hayes, N. L., & Nowakowski, R. S. (1997). Synchrony of clonal cell proliferation and contiguity of clonally related cells: production of mosaicism in the ventricular zone of

developing mouse neocortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *17*(6), 2088–100.

Callus, B. a, Verhagen, A. M., & Vaux, D. L. (2006). Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *The FEBS Journal*, *273*(18), 4264–76. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05427.x

Camargo, F. D., Gokhale, S., Johnnidis, J. B., Fu, D., Bell, G. W., Jaenisch, R., & Brummelkamp, T. R. (2007). YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Current Biology : CB*, *17*(23), 2054–60. doi:10.1016/j.cub.2007.10.039

Campbell, C., Risueno, R. M., Salati, S., Guezguez, B., & Bhatia, M. (2008). Signal control of hematopoietic stem cell fate: Wnt, Notch, and Hedgehog as the usual suspects. *Current Opinion in Hematology*, *15*(4), 319–25. doi:10.1097/MOH.0b013e328303b9df

Cao, X., Pfaff, S. L., & Gage, F. H. (2008). YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes & Development*, *22*(23), 3320–34. doi:10.1101/gad.1726608

Cappello, S., Gray, M. J., Badouel, C., Lange, S., Einsiedler, M., Srour, M., … Robertson, S. P. (2013). Mutations in genes encoding the cadherin receptor-ligand pair DCHS1 and FAT4 disrupt cerebral cortical development. *Nature Genetics*, *45*(11), 1300–8. doi:10.1038/ng.2765

Casarosa, S., Leone, P., Cannata, S., Santini, F., Pinchera, a, Barsacchi, G., & Andreazzoli, M. (2005). Genetic analysis of metamorphic and premetamorphic Xenopus ciliary marginal zone. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *233*(2), 646–51. doi:10.1002/dvdy.20369

Casas-Delucchi, C. S., Brero, A., Rahn, H.-P., Solovei, I., Wutz, A., Cremer, T., … Cardoso, M. C. (2011). Histone acetylation controls the inactive X chromosome replication dynamics. *Nature Communications*, *2*, 222. doi:10.1038/ncomms1218

Centanin, L., Ander, J.-J., Hoeckendorf, B., Lust, K., Kellner, T., Kraemer, I., … Wittbrodt, J. (2014). Exclusive multipotency and preferential asymmetric divisions in post-embryonic neural stem cells of the fish retina. *Development (Cambridge, England)*, (August), 1–11. doi:10.1242/dev.109892

Centanin, L., Hoeckendorf, B., & Wittbrodt, J. (2011). Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell Stem Cell*, *9*(6), 553–62. doi:10.1016/j.stem.2011.11.004

Cepko, C. L., Austin, C. P., Yang, X., Alexiades, M., & Ezzeddine, D. (1996). Cell deternination, *93*(January), 589–595.

Chan, E. H. Y., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R. B., Schäfer, A., Nigg, E. a, & Silljé, H. H. W. (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*, *24*(12), 2076–86. doi:10.1038/sj.onc.1208445

Chan, S. W., Lim, C. J., Chong, Y. F., Pobbati, A. V, Huang, C., & Hong, W. (2011). Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomotin. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(9), 7018–26. doi:10.1074/jbc.C110.212621

Chan, S. W., Lim, C. J., Loo, L. S., Chong, Y. F., Huang, C., & Hong, W. (2009). TEADs mediate nuclear retention of TAZ to promote oncogenic transformation. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(21), 14347–58. doi:10.1074/jbc.M901568200

Chen, Q., Zhang, N., Gray, R. S., Li, H., Ewald, A. J., Zahnow, C., A., Pan, D. (2014). A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. *Genes & Development , 28(5)*, 432-7. doi: 10.1101/gad.233676.113

Chen, C.-L., Gajewski, K. M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., & Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(36), 15810–5. doi:10.1073/pnas.1004060107

Chen, L., Loh, P. G., & Song, H. (2010). Structural and functional insights into the TEAD-YAP complex in the Hippo signaling pathway. *Protein & Cell*, *1*(12), 1073–83. doi:10.1007/s13238-010-0138-3

Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., & Mizuno, K. (2009). MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Current Biology : CB*, *19*(8), 675–81. doi:10.1016/j.cub.2009.02.054

Cho, E., Feng, Y., Rauskolb, C., Maitra, S., Fehon, R., & Irvine, K. D. (2006). Delineation of a Fat tumor suppressor pathway. *Nature Genetics*, *38*(10), 1142–50. doi:10.1038/ng1887

Cho, E., & Irvine, K. D. (2004). Action of fat, four-jointed, dachsous and dachs in distal-to-proximal wing signaling. *Development (Cambridge, England)*, *131*(18), 4489–500. doi:10.1242/dev.01315

Cho, S.-H., & Cepko, C. L. (2006). Wnt2b/beta-catenin-mediated canonical Wnt signaling determines the peripheral fates of the chick eye. *Development (Cambridge, England)*, *133*(16), 3167–77. doi:10.1242/dev.02474

Cicero, S. A., Johnson, D., Reyntjens, S., Frase, S., Connell, S., Chow, L. M. L., … Dyer, M. A. (2009). Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells.

Close J. L., Liu J., Gumuscu B. & Reh T. A. (2006). Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal retina. *Glia*, 54(2), 94-104.

Cockburn, K., Biechele, S., Garner, J., & Rossant, J. (2013). The Hippo pathway member Nf2 is required for inner cell mass specification. *Current Biology : CB*, *23*(13), 1195–201. doi:10.1016/j.cub.2013.05.044

Cooper, A. F., Yu, K. P., Brueckner, M., Brailey, L. L., Johnson, L., McGrath, J. M., & Bale, A. E. (2005). Cardiac and CNS defects in a mouse with targeted disruption of suppressor of fused. *Development (Cambridge, England)*, *132*(19), 4407–17. doi:10.1242/dev.02021

Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., … Piccolo, S. (2011). The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell*, *147*(4), 759–72. doi:10.1016/j.cell.2011.09.048

Cui, C. Bin, Cooper, L. F., Yang, X., Karsenty, G., & Aukhil, I. (2003a). Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor Cbfa1 by TAZ Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor Cbfa1 by TAZ. doi:10.1128/MCB.23.3.1004

Cui, C. Bin, Cooper, L. F., Yang, X., Karsenty, G., & Aukhil, I. (2003b). Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor Cbfa1 by TAZ Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor Cbfa1 by TAZ. doi:10.1128/MCB.23.3.1004

D

D'Addario, I., Abbruzzese, C., Lo Iacono, M., Teson, M., Golisano, O., & Barone, V. (2010). Overexpression of YAP1 induces immortalization of normal human keratinocytes by blocking clonal evolution. *Histochemistry and Cell Biology*, *134*(3), 265–76. doi:10.1007/s00418-010-0728-4

Daniels, M., Dhokia, V., Richard-Parpaillon, L., & Ohnuma, S.-I. (2004). Identification of Xenopus cyclin-dependent kinase inhibitors, p16Xic2 and p17Xic3. *Gene*, *342*(1), 41–7. doi:10.1016/j.gene.2004.07.038

Das Thakur, M., Feng, Y., Jagannathan, R., Seppa, M. J., Skeath, J. B., & Longmore, G. D. (2010). Ajuba LIM proteins are negative regulators of the Hippo signaling pathway. *Current Biology : CB*, *20*(7), 657–62. doi:10.1016/j.cub.2010.02.035

Das, A. V, James, J., Rahnenführer, J., Thoreson, W. B., Bhattacharya, S., Zhao, X., & Ahmad, I. (2005). Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Research*, *45*(13), 1653–66. doi:10.1016/j.visres.2004.12.017

Das, A. V, James, J., Zhao, X., Rahnenführer, J., & Ahmad, I. (2004). Identification of c-Kit receptor as a regulator of adult neural stem cells in the mammalian eye: interactions with Notch signaling. *Developmental Biology*, *273*(1), 87–105. doi:10.1016/j.ydbio.2004.05.023

Das, A. V, Mallya, K. B., Zhao, X., Ahmad, F., Bhattacharya, S., Thoreson, W. B., … Ahmad, I. (2006). Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Developmental Biology*, *299*(1), 283–302. doi:10.1016/j.ydbio.2006.07.029

Day T. F., Yang Y. (2008). Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, *90*, doi: 10.2106/JBJS.G.01174.

Deflorian, G., Tiso, N., Ferretti, E., Meyer, D., Blasi, F., Bortolussi, M., & Argenton, F. (2004). Prep1.1 has essential genetic functions in hindbrain development and cranial neural crest cell differentiation. *Development (Cambridge, England)*, *131*(3), 613–27. doi:10.1242/dev.00948

Del Debbio, C. B., Peng, X., Xiong, H., & Ahmad, I. (2013). Adult ciliary epithelial stem cells generate functional neurons and differentiate into both early and late born retinal neurons under non-cell autonomous influences. *BMC Neuroscience*, *14*(1), 130. doi:10.1186/1471-2202-14-130

Del Re, D. P., Yang, Y., Nakano, N., Cho, J., Zhai, P., Yamamoto, T., … Sadoshima, J. (2013). Yes-associated protein isoform 1 (Yap1) promotes cardiomyocyte survival and growth to protect against myocardial ischemic injury. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(6), 3977–88. doi:10.1074/jbc.M112.436311

Del Rio-Tsonis, K., & Tsonis, P. a. (2003). Eye regeneration at the molecular age. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *226*(2), 211–24. doi:10.1002/dvdy.10224

Demircan T., Berezikov E. (2013). The Hippo pathway regulates stem cells during homeostasis and regeneration of the flatworm Macrostomum lignano. *Stem cells and development*, 22(15), 2174-85. doi: 10.1089/scd.2013.0006.

Demontis, G. C., Aruta, C., Comitato, A., De Marzo, A., & Marigo, V. (2012). Functional and molecular characterization of rod-like cells from retinal stem cells derived from the adult ciliary epithelium. *PloS One*, *7*(3), e33338. doi:10.1371/journal.pone.0033338

Denayer, T., Locker, M., Borday, C., Deroo, T., Janssens, S., Hecht, A., … Vleminckx, K. (2008). Canonical Wnt signaling controls proliferation of retinal stem/progenitor cells in postembryonic Xenopus eyes. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *26*(8), 2063–74. doi:10.1634/stemcells.2007-0900

Di Rosa, P., Villaescusa, J. C., Longobardi, E., Iotti, G., Ferretti, E., Diaz, V. M., … Blasi, F. (2007). The homeodomain transcription factor Prep1 (pKnox1) is required for hematopoietic stem and progenitor cell activity. *Developmental Biology*, *311*(2), 324–34. doi:10.1016/j.ydbio.2007.08.031

Díaz, V. M., Bachi, A., & Blasi, F. (2007). Purification of the Prep1 interactome identifies novel pathways regulated by Prep1. *Proteomics*, *7*(15), 2617–23. doi:10.1002/pmic.200700197

Dominguez-Sola, D., Ying, C. Y., Grandori, C., Ruggiero, L., Chen, B., Li, M., … Dalla-Favera, R. (2007). Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*, *448*(7152), 445–51. doi:10.1038/nature05953

Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. a, … Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell*, *130*(6), 1120–33. doi:10.1016/j.cell.2007.07.019

Dorsky, R. I., Sheldahl, L. C., & Moon, R. T. (2002). A transgenic Lef1/beta-catenin-dependent reporter is expressed in spatially restricted domains throughout zebrafish development. *Developmental Biology*, *241*(2), 229–37. doi:10.1006/dbio.2001.0515

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., … Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, *474*(7350), 179–83. doi:10.1038/nature10137

Dyer M. A. & Cepko C. L. (2000). Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nature Neuroscience*, 3(9), 873-80.

E

Eguchi G. (1986). Instability in cell commitment of vertebrate pigmented epithelial cells and their transdifferentiation into lens cells. *Current topics in developmental biology*, 20, 21-37

Eiraku, M., & Sasai, Y. (2012). Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. *Nature Protocols*, *7*(1), 69–79. doi:10.1038/nprot.2011.429

El Yakoubi, W., Borday, C., Hamdache, J., Parain, K., Tran, H. T., Vleminckx, K., … Locker, M. (2012). Hes4 controls proliferative properties of neural stem cells during retinal ontogenesis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *30*(12), 2784–95. doi:10.1002/stem.1231

Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, *126*(4), 677–89. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044

Espanel, X., & Sudol, M. (2001). Yes-associated protein and p53-binding protein-2 interact through their WW and SH3 domains. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(17), 14514–23. doi:10.1074/jbc.M008568200

F

Fausett, B. V, & Goldman, D. (2006). A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(23), 6303–13. doi:10.1523/JNEUROSCI.0332-06.2006

Feng, Y., & Irvine, K. D. (2009). Processing and phosphorylation of the Fat receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(29), 11989–94. doi:10.1073/pnas.0811540106

Fernandez-Diaz, L. C., Laurent, A., Girasoli, S., Turco, M., Longobardi, E., Iotti, G., … Blasi, F. (2010). The absence of Prep1 causes p53-dependent apoptosis of mouse pluripotent epiblast cells. *Development (Cambridge, England)*, *137*(20), 3393–403. doi:10.1242/dev.050567

Fernandez-L, A., Northcott, P. a, Dalton, J., Fraga, C., Ellison, D., Angers, S., … Kenney, A. M. (2009). YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes & Development*, *23*(23), 2729–41. doi:10.1101/gad.1824509

Ferretti, E., Villaescusa, J. C., Di Rosa, P., Fernandez-Diaz, L. C., Longobardi, E., Mazzieri, R., … Blasi, F. (2006). Hypomorphic mutation of the TALE gene Prep1 (pKnox1) causes a major reduction of Pbx and Meis proteins and a pleiotropic embryonic phenotype. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(15), 5650–62. doi:10.1128/MCB.00313-06

Ferretti, E., Villaescusa, J. C., Rosa, P. Di, Fernandez-diaz, L. C., Longobardi, E., Miccio, A., … Mazzieri, R. (2006). Hypomorphic Mutation of the TALE Gene Prep1 (pKnox1) Causes a Major Reduction of Pbx and Meis Proteins and a Pleiotropic Embryonic Phenotype Hypomorphic Mutation of the TALE Gene Prep1 (pKnox1) Causes a Major Reduction of Pbx and Meis Proteins and a P, *1*. doi:10.1128/MCB.00313-06

Ferrigno, O., Lallemand, F., Verrecchia, F., L'Hoste, S., Camonis, J., Atfi, A., & Mauviel, A. (2002). Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. *Oncogene*, *21*(32), 4879–84. doi:10.1038/sj.onc.1205623

Fimbel, S. M., Montgomery, J. E., Burket, C. T., & Hyde, D. R. (2007). Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(7), 1712–24. doi:10.1523/JNEUROSCI.5317-06.2007

Fischer, a J., Hendrickson, a, & Reh, T. a. (2001). Immunocytochemical characterization of cysts in the peripheral retina and pars plana of the adult primate. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *42*(13), 3256–63. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726631

Fischer, a J., & Reh, T. a. (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Developmental Biology*, *220*(2), 197–210. doi:10.1006/dbio.2000.9640

Fischer, A. J., Dierks, B. D., & Reh, T. a. (2002). Exogenous growth factors induce the production of ganglion cells at the retinal margin. *Development (Cambridge, England)*, *129*(9), 2283–91. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959835

Fort, P. O., & Araki, M. (2007). A comparative study of amphibian retinal regeneration by tissue culture technology, *661*(2), 77–95.

French, C. R., Erickson, T., Callander, D., Berry, K. M., Koss, R., Hagey, D. W., … Waskiewicz, A. J. (2007). Pbx homeodomain proteins pattern both the zebrafish retina and tectum. *BMC Developmental Biology*, *7*, 85. doi:10.1186/1471-213X-7-85

G

Ganem, N. J., Cornils, H., Chiu, S.-Y., O'Rourke, K. P., Arnaud, J., Yimlamai, D., … Pellman, D. (2014). Cytokinesis Failure Triggers Hippo Tumor Suppressor Pathway Activation. *Cell*, *158*(4), 833–848. doi:10.1016/j.cell.2014.06.029

Gao, T., Zhou, D., Yang, C., Singh, T., Penzo-, A., Maddipati, R., … Bardeesy, N. (2014). NIH Public Access, *144*(7), 1543–1553. doi:10.1053/j.gastro.2013.02.037.Hippo

Gaspar, P., & Tapon, N. (2014). Sensing the local environment: actin architecture and Hippo signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, *31*, 74–83. doi:10.1016/j.ceb.2014.09.003

Gee, S. T., Milgram, S. L., Kramer, K. L., Conlon, F. L., & Moody, S. a. (2011). Yes-associated protein 65 (YAP) expands neural progenitors and regulates Pax3 expression in the neural plate border zone. *PloS One*, *6*(6), e20309. doi:10.1371/journal.pone.0020309

Genevet, A., Polesello, C., Blight, K., Robertson, F., Collinson, L. M., Pichaud, F., & Tapon, N. (2009). The Hippo pathway regulates apical-domain size independently of its growth-control function. *Journal of Cell Science*, *122*(Pt 14), 2360–70. doi:10.1242/jcs.041806

Genevet, A., & Tapon, N. (2011). The Hippo pathway and apico-basal cell polarity. *The Biochemical Journal*, *436*(2), 213–24. doi:10.1042/BJ20110217

Genevet, A., Wehr, M. C., Brain, R., Thompson, B. J., & Tapon, N. (2010). Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. *Developmental Cell*, *18*(2), 300–8. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.011

George, N. M., Day, C. E., Boerner, B. P., Johnson, R. L., & Sarvetnick, N. E. (2012). Hippo signaling regulates pancreas development through inactivation of Yap. *Molecular and Cellular Biology*, *32*(24), 5116–28. doi:10.1128/MCB.01034-12

Goldman, D. (2014). Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nature Reviews. Neuroscience*, *15*(7), 431–42. doi:10.1038/nrn3723

Gorrini, C., Squatrito, M., Luise, C., Syed, N., Perna, D., Wark, L., … Amati, B. (2007). Tip60 is a haplo-insufficient tumour suppressor required for an oncogene-induced DNA damage response. *Nature*, *448*(7157), 1063–7. doi:10.1038/nature06055

Goulev, Y., Fauny, J. D., Gonzalez-Marti, B., Flagiello, D., Silber, J., & Zider, A. (2008). SCALLOPED interacts with YORKIE, the nuclear effector of the hippo tumor-suppressor pathway in Drosophila. *Current Biology : CB*, *18*(6), 435–41. doi:10.1016/j.cub.2008.02.034

Graw, J. (2010). Eye development. *Current Topics in Developmental Biology*, *90*(10), 343–86. doi:10.1016/S0070-2153(10)90010-0

Grijalva, J. L., Huizenga, M., Mueller, K., Rodriguez, S., Brazzo, J., Camargo, F., … Vakili, K. (2014). Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *307*(2), G196–204. doi:10.1152/ajpgi.00077.2014

Grzeschik, N. a, Parsons, L. M., Allott, M. L., Harvey, K. F., & Richardson, H. E. (2010). Lgl, aPKC, and Crumbs regulate the Salvador/Warts/Hippo pathway through two distinct mechanisms. *Current Biology : CB*, *20*(7), 573–81. doi:10.1016/j.cub.2010.01.055

Gualdoni, S., Baron, M., Lakowski, J., Decembrini, S., Smith, A. J., Pearson, R. a, … Sowden, J. C. (2010). Adult ciliary epithelial cells, previously identified as retinal stem cells with potential for retinal repair, fail to differentiate into new rod photoreceptors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *28*(6), 1048–59. doi:10.1002/stem.423

Gumbiner, B. M., & Kim, N.-G. (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *Journal of Cell Science*, *127*(Pt 4), 709–17. doi:10.1242/jcs.140103

Gutmann, D. H., Hirbe, a C., & Haipek, C. a. (2001). Functional analysis of neurofibromatosis 2 (NF2) missense mutations. *Human Molecular Genetics*, *10*(14), 1519–29. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448944

H

Halder, G., Dupont, S., & Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *13*(9), 591–600. doi:10.1038/nrm3416

Hamaratoglu, F., Willecke, M., Kango-Singh, M., Nolo, R., Hyun, E., Tao, C., … Halder, G. (2006). The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nature Cell Biology*, *8*(1), 27–36. doi:10.1038/ncb1339

Hansen, R. S., Thomas, S., Sandstrom, R., Canfield, T. K., Thurman, R. E., Weaver, M., … Stamatoyannopoulos, J. a. (2010). Sequencing newly replicated DNA reveals widespread plasticity in human replication timing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(1), 139–44. doi:10.1073/pnas.0912402107

Hariharan, I. K., & Bilder, D. (2006). Regulation of imaginal disc growth by tumor-suppressor genes in Drosophila. *Annual Review of Genetics*, *40*, 335–61. doi:10.1146/annurev.genet.39.073003.100738

Harris, S. L., & Levine, A. J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, *24*(17), 2899–908. doi:10.1038/sj.onc.1208615

Haruta, M., Kosaka, M., Kanegae, Y., Saito, I., Inoue, T., Kageyama, R., … Takahashi, M. (2001). Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nature Neuroscience*, *4*(12), 1163–4. doi:10.1038/nn762

Harvey, K. F., Pfleger, C. M., & Hariharan, I. K. (2003). The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*, *114*(4), 457–67. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941274

Harvey, K. F., Zhang, X., & Thomas, D. M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(4), 246–57. doi:10.1038/nrc3458

Harvey, K., & Tapon, N. (2007). The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. *Nature Reviews. Cancer*, *7*(3), 182–91. doi:10.1038/nrc2070

Hau J. C., Erdmann D., Mesrouze Y., Furet P., Fontana P., Zimmermann C., Schmelzle T., Hofmann F., Chène P. (2013). The TEAD4-YAP/TAZ protein-protein interaction: expected similarities and unexpected differences. *Chembiochem*, 14(10), 1218-25.

Hayashi, S., Tamura, K., & Yokoyama, H. (2014). Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for Xenopus limb bud regeneration. *Developmental Biology*, *388*(1), 57–67. doi:10.1016/j.ydbio.2014.01.018

Heallen, T., Morikawa, Y., Leach, J., Tao, G., Willerson, J. T., Johnson, R. L., & Martin, J. F. (2013). Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development (Cambridge, England)*, *140*(23), 4683–90. doi:10.1242/dev.102798

Heallen, T., Zhang, M., Wang, J., Bonilla-Claudio, M., Klysik, E., Johnson, R. L., & Martin, J. F. (2011). Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6028), 458–61. doi:10.1126/science.1199010

Heavner, W., & Pevny, L. (2012). Eye development and retinogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*(12). doi:10.1101/cshperspect.a008391

Henry J. J., Wever J. M., Vergara M. N., Fukui L. (2008). Xenopus, an ideal vertebrate system for studies of eye development and regeneration. *Tsonis PA (ed) Animals models in eye research*. Academic press.

Hergovich, A., & Hemmings, B. a. (2012). Hippo signalling in the G2/M cell cycle phase: lessons learned from the yeast MEN and SIN pathways. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(7), 794–802. doi:10.1016/j.semcdb.2012.04.001

Hidalgo M., Locker M., Chesneau A., Perron M. (2014). Stem cells and regeneration in the Xenopus retina. *Regenerative Biology of the Eye*, Stem cell biology and regenerative medecine.

Hiemer, S. E., Szymaniak, A. D., & Varelas, X. (2014). The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor β-induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(19), 13461–74. doi:10.1074/jbc.M113.529115

Hiemer, S. E., & Varelas, X. (2013). Stem cell regulation by the Hippo pathway. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1830*(2), 2323–34. doi:10.1016/j.bbagen.2012.07.005

Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K.-I., Suzuki, A., Alarcon, V. B., Akimoto, K., … Sasaki, H. (2013). Polarity-dependent distribution of angiomotin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Current Biology : CB*, *23*(13), 1181–94. doi:10.1016/j.cub.2013.05.014

Hitchcock, P. F. (1998). Insulin-Related Growth Factors Stimulate Proliferation of Retinal, *394*(December 1997), 386–394.

Hitchcock, P. F., & Raymond, P. a. (1992). Retinal regeneration. *Trends in Neurosciences*, *15*(3), 103–108. doi:10.1016/0166-2236(92)90020-9

Hitchcock, P., Ochocinska, M., Sieh, A., & Otteson, D. (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, *23*(2), 183–94. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.01.001

Hollyfield, J. G. (1968). Differential addition of cells to the retina in Rana pipiens tadpoles. *Developmental Biology*, *18*(2), 163–79. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5672879

Hollyfield, J. G. (1971). Differential growth of the neural retina in Xenopus laevis larvae. *Developmental Biology*, *24*(2), 264-86

Holt, E., Bertsch, W., & Harris, A. (1988). Cellular Determination in the Xenopus Retina Is Independent of Lineage and Birth Date division, *1*, 15–26.

Home, P., Saha, B., Ray, S., Dutta, D., Gunewardena, S., Yoo, B., … Paul, S. (2012). Altered subcellular localization of transcription factor TEAD4 regulates fi rst mammalian cell lineage commitment. doi:10.1073/pnas.1201595109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1201595109

Hong, J.-H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., … Yaffe, M. B. (2005a). TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, *309*(5737), 1074–8. doi:10.1126/science.1110955

Hong, J.-H., Hwang, E. S., McManus, M. T., Amsterdam, A., Tian, Y., Kalmukova, R., … Yaffe, M. B. (2005b). TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science (New York, N.Y.)*, *309*(5737), 1074–8. doi:10.1126/science.1110955

Hong, W., & Guan, K.-L. (2012). The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(7), 785–93. doi:10.1016/j.semcdb.2012.05.004

Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., & Wong, R. O. L. (2014). Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, *42C*, 44–84. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.06.003

Hossain, Z., Ali, S. M., Ko, H. L., Xu, J., Ng, C. P., Guo, K., … Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of Wwtr1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(5), 1631–6. doi:10.1073/pnas.0605266104

Huang, J., & Kalderon, D. (2014). Coupling of Hedgehog and Hippo pathways promotes stem cell maintenance by stimulating proliferation. *The Journal of Cell Biology*, *205*(3), 325–38. doi:10.1083/jcb.201309141

Huang, J., Nagatomo, I., Suzuki, E., Mizuno, T., & Kumagai, T. (2013). NIH Public Access, *32*(17), 2220–2229. doi:10.1038/onc.2012.231.YAP

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., & Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. *Cell*, *122*(3), 421–34. doi:10.1016/j.cell.2005.06.007

I

Ide, C. F., Reynolds P., Tompkins R. (1984). Two healing patterns correlate with different adult neural connectivity patterns in regenerating embryonic Xenopus retina. *The Journal of experimental zoologie*, 230(1), 71-80.

Ide, C. F., Wunsh, L. M., Lecat, P. J., Kahn, D., & Noelke, E. L. (1987). Healing modes correlate with visuotectal pattern formation in regenerating embryonic Xenopus retina. *Developmental Biology*, *124*(2), 316–30. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3678599

Ihrie, R. a, Shah, J. K., Harwell, C. C., Levine, J. H., Guinto, C. D., Lezameta, M., … Alvarez-Buylla, A. (2011). Persistent sonic hedgehog signaling in adult brain determines neural stem cell positional identity. *Neuron*, *71*(2), 250–62. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.018

Imajo, M., Miyatake, K., Iimura, A., Miyamoto, A., & Nishida, E. (2012). A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/β-catenin signalling. *The EMBO Journal*, *31*(5), 1109–22. doi:10.1038/emboj.2011.487

Inoue, T. (2010). NIH Public Access, *28*(3), 489–500. doi:10.1002/stem.279.Maximizing

Inoue, T., Kagawa, T., Fukushima, M., Shimizu, T., Yoshinaga, Y., Takada, S., … Taga, T. (2006). Activation of canonical Wnt pathway promotes proliferation of retinal stem cells derived from adult mouse ciliary margin. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *24*(1), 95–104. doi:10.1634/stemcells.2005-0124

Iotti, G., Longobardi, E., Masella, S., Dardaei, L., De Santis, F., Micali, N., & Blasi, F. (2011). Homeodomain transcription factor and tumor suppressor Prep1 is required to maintain genomic stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(29), E314. doi:10.1073/pnas.1105216108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1105216108

Iotti, G., Longobardi, E., Masella, S., Dardaei, L., Santis, F. De, Micali, N., & Blasi, F. (2011). Homeodomain transcription factor and tumor suppressor Prep1 is required to maintain genomic stability. doi:10.1073/pnas.1105216108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1105216108

Ishikawa, H. O., Takeuchi, H., Haltiwanger, R. S., & Irvine, K. D. (2008). Four-jointed is a Golgi kinase that phosphorylates a subset of cadherin domains. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5887), 401–4. doi:10.1126/science.1158159

J

Jansson, L., & Larsson, J. (2012). Normal hematopoietic stem cell function in mice with enforced expression of the Hippo signaling effector YAP1. *PloS One*, *7*(2), e32013. doi:10.1371/journal.pone.0032013

Jia, J., Zhang, W., Wang, B., Trinko, R., & Jiang, J. (2003). The Drosophila Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes & Development*, *17*(20), 2514–9. doi:10.1101/gad.1134003

Jian, Q., Xu, H., Xie, H., Tian, C., Zhao, T., & Yin, Z. (2009). Activation of retinal stem cells in the proliferating marginal region of RCS rats during development of retinitis pigmentosa. *Neuroscience Letters*, *465*(1), 41–4. doi:10.1016/j.neulet.2009.07.083

Jiang, Q., Liu, D., Gong, Y., Wang, Y., Sun, S., Gui, Y., & Song, H. (2009). Yap Is Required for the Development of Brain, Eyes, and Neural Crest in Zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *384*(1), 114–9. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.070

Jiang, Z., Li, X., Hu, J., Zhou, W., Jiang, Y., Li, G., & Lu, D. (2006). Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma. *Neuroscience Research*, *56*(4), 450–8. doi:10.1016/j.neures.2006.09.006

Jiao, S., Wang, H., Shi, Z., Dong, A., Zhang, W., Song, X., … Zhou, Z. (2014). A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer Cell*, *25*(2), 166–80. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.010

Johnson, R., & Halder, G. (2014). The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(1), 63–79. doi:10.1038/nrd4161

Jukam, D., & Desplan, C. (2011). Binary regulation of Hippo pathway by Merlin/NF2, Kibra, Lgl, and Melted specifies and maintains postmitotic neuronal fate. *Developmental Cell*, *21*(5), 874–87. doi:10.1016/j.devcel.2011.10.004

Jukam, D., Xie, B., Rister, J., Terrell, D., Charlton-Perkins, M., Pistillo, D., … Cook, T. (2013). Opposite feedbacks in the Hippo pathway for growth control and neural fate. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6155), 1238016. doi:10.1126/science.1238016

Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M., & Bryant, P. J. (1995). The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development*, *9*(5), 534–546. doi:10.1101/gad.9.5.534

K

Kamikubo, Y., Takaori-Kondo, A., Uchiyama, T., & Hori, T. (2003). Inhibition of cell growth by conditional expression of kpm, a human homologue of Drosophila warts/lats tumor suppressor. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(20), 17609–14. doi:10.1074/jbc.M211974200

Kanai, F., Marignani, P. a, Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R. a, Donowitz, M., … Yaffe, M. B. (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *The EMBO Journal*, *19*(24), 6778–91. doi:10.1093/emboj/19.24.6778

Kanekar, S., Perron, M., Dorsky, R., Harris, W. a, Jan, L. Y., Jan, Y. N., & Vetter, M. L. (1997). Xath5 participates in a network of bHLH genes in the developing Xenopus retina. *Neuron*, *19*(5), 981–94. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9390513

Kango-Singh, M. (2002). Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in Drosophila. *Development*, *129*(24), 5719–5730. doi:10.1242/dev.00168

Kango-Singh, M., & Singh, A. (2009). Regulation of organ size: insights from the Drosophila Hippo signaling pathway. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *238*(7), 1627–37. doi:10.1002/dvdy.21996

Karl, M. O., Hayes, S., Nelson, B. R., Tan, K., Buckingham, B., & Reh, T. a. (2008). Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(49), 19508–13. doi:10.1073/pnas.0807453105

Karl, M. O., & Reh, T. a. (2010). Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends in Molecular Medicine*, *16*(4), 193–202. doi:10.1016/j.molmed.2010.02.003

Karpowicz, P., Perez, J., & Perrimon, N. (2010). The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development (Cambridge, England)*, *137*(24), 4135–45. doi:10.1242/dev.060483

Katoh, Y., & Katoh, M. (2006). WNT antagonist, SFRP1, is Hedgehog signaling target, 171–175.

Kim, N., Koh, E., Chen, X., & Gumbiner, B. M. (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components, *2011*. doi:10.1073/pnas.1103345108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103345108

Koberna, K., Ligasova, A., Malinsky. J., Pliss, A., Cvackova, Z., Fidlerova, H., Masata, M., ... Berezney, R. (2005). Electron microscopy of DNA replication in 3-D: evidence for similar-sized replication foci throughout S-phase. *Journal of cellular biochemistry, 94(1)*, 126-38

Kohli, P., Bartram, M. P., Habbig, S., Pahmeyer, C., Lamkemeyer, T., Benzing, T., … Rinschen, M. M. (2014). Label-free quantitative proteomic analysis of the YAP/TAZ interactome. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *306*(9), C805–18. doi:10.1152/ajpcell.00339.2013

Komuro, A., Nagai, M., Navin, N. E., & Sudol, M. (2003). WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(35), 33334–41. doi:10.1074/jbc.M305597200

Konsavage, W. M., Kyler, S. L., Rennoll, S. a, Jin, G., & Yochum, G. S. (2012). Wnt/β-catenin signaling regulates Yes-associated protein (YAP) gene expression in colorectal carcinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(15), 11730–9. doi:10.1074/jbc.M111.327767

Koontz, L. M., Liu-Chittenden, Y., Yin, F., Zheng, Y., Yu, J., Huang, B., … Pan, D. (2013). The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. *Developmental Cell*, *25*(4), 388–401. doi:10.1016/j.devcel.2013.04.021

Kubo, F. (2003). Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development*, *130*(3), 587–598. doi:10.1242/dev.00244

Kubo, F., Takeichi, M., & Nakagawa, S. (2005). Wnt2b inhibits differentiation of retinal progenitor cells in the absence of Notch activity by downregulating the expression of proneural genes. *Development (Cambridge, England)*, *132*(12), 2759–70. doi:10.1242/dev.01856

Kubota, R., Hokoc, J. N., Moshiri, a, McGuire, C., & Reh, T. a. (2002). A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *134*(1-2), 31–41. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11947935

Kuriyama, F., Ueda, Y., & Araki, M. (2009). Complete reconstruction of the retinal laminar structure from a cultured retinal pigment epithelium is triggered by altered tissue interaction and promoted by overlaid extracellular matrices. *Developmental Neurobiology*, *69*(14), 950–8. doi:10.1002/dneu.20745

L

Lai, D., Ho, K. C., Hao, Y., & Yang, X. (2011). Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Research*, *71*(7), 2728–38. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2711

Lai, Z.-C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., … Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. *Cell*, *120*(5), 675–85. doi:10.1016/j.cell.2004.12.036

Lajeunesse, D. R., Mccartney, B. M., & Fehon, R. G. (1998). Structural Analysis of, *141*(7), 1589–1599.

Lamar, J. M., Stern, P., Liu, H., Schindler, J. W., Jiang, Z.-G., & Hynes, R. O. (2012). The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(37), E2441–50. doi:10.1073/pnas.1212021109

Laprise P., Tepass U. (2011). Novel insights into epithelial polarity proteins in Drosophila. *Trends in cell biology*, 21(7), 401-8.

Laprise P. (2011). Emerging role for epithelial polarity proteins of the Crumbs family as potential tumor supressors. Journal of biomedicine & biotechnology. doi:10.1155/2011/868217

Lavado, A., He, Y., Paré, J., Neale, G., Olson, E. N., Giovannini, M., & Cao, X. (2013). Tumor suppressor Nf2 limits expansion of the neural progenitor pool by inhibiting Yap/Taz transcriptional coactivators. *Development (Cambridge, England)*, *140*(16), 3323–34. doi:10.1242/dev.096537

Lawrence, J. M., Singhal, S., Bhatia, B., Keegan, D. J., Reh, T. a, Luthert, P. J., … Limb, G. A. (2007). MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *25*(8), 2033–43. doi:10.1634/stemcells.2006-0724

Le Dréau, G., & Martí, E. (2012). Dorsal-ventral patterning of the neural tube: a tale of three signals. *Developmental Neurobiology*, *72*(12), 1471–81. doi:10.1002/dneu.22015

Lee, H.-S., Bong, Y.-S., Moore, K. B., Soria, K., Moody, S. a, & Daar, I. O. (2006). Dishevelled mediates ephrinB1 signalling in the eye field through the planar cell polarity pathway. *Nature Cell Biology*, *8*(1), 55–63. doi:10.1038/ncb1344

Lee, J.-H., Kim, T.-S., Yang, T.-H., Koo, B.-K., Oh, S.-P., Lee, K.-P., … Lim, D.-S. (2008). A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. *The EMBO Journal*, *27*(8), 1231–42. doi:10.1038/emboj.2008.63

Lee, K., Lee, J., Kim, T., Kim, T., Park, H., Byun, J., & Kim, M. (2010). The Hippo – Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation , liver size , and liver tumorigenesis, 1–6.

doi:10.1073/pnas.0912203107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912203107

Lei, Q.-Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.-Y., Bai, F., Pei, X.-H., … Guan, K.-L. (2008). TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(7), 2426–36. doi:10.1128/MCB.01874-07

Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y., & Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development (Cambridge, England)*, *124*(3), 603–15. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2041934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract

Li, V. C., Ballabeni, A., & Kirschner, M. W. (2012a). Gap 1 phase length and mouse embryonic stem, *2012*. doi:10.1073/pnas.1206740109/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1206740109

Li, V. C., Ballabeni, A., & Kirschner, M. W. (2012b). Gap 1 phase length and mouse embryonic stem cell self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(31), 12550–5. doi:10.1073/pnas.1206740109

Li, W., Cooper, J., Zhou, L., Yang, C., Erdjument-Bromage, H., Zagzag, D., … Giancotti, F. G. (2014). Merlin/NF2 Loss-Driven Tumorigenesis Linked to CRL4DCAF1-Mediated Inhibition of the Hippo Pathway Kinases Lats1 and 2 in the Nucleus. *Cancer Cell*, *26*(1), 48–60. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.001

Li, W., & Giancotti, F. G. (2010). Merlin's tumor suppression linked to inhibition of the E3 ubiquitin ligase CRL4DCAF1. *Cell Cycle*, *9*(22), 4433–4436. doi:10.4161/cc.9.22.13838

Li Y. (2012). T ISSUE -S PECIFIC S TEM C ELLS Genome-Wide Analysis of N1ICD / RBPJ Targets in Vivo Reveals Direct Transcriptional Regulation of Wnt , SHH , and, (207), 741–752. doi:10.1002/stem.2011

Li, Y., Pei, J., Xia, H., Ke, H., Wang, H., & Tao, W. (2003). Lats2, a putative tumor suppressor, inhibits G1/S transition. *Oncogene*, *22*(28), 4398–405. doi:10.1038/sj.onc.1206603

Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., … Guan, K.-L. (2010). The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & Development*, *24*(11), 1106–18. doi:10.1101/gad.1903310

Limb G. A., Lawrence J. M., Reh T. A. & Khaw P. T. (2005). Localization of Müller glia with neural stem cell characteristics in the adult human retina. Investigative *Ophtalmology & Visual Science, 46.*

Lin, Y.-T., Ding, J.-Y., Li, M.-Y., Yeh, T.-S., Wang, T.-W., & Yu, J.-Y. (2012). YAP regulates neuronal differentiation through Sonic hedgehog signaling pathway. *Experimental Cell Research*, *318*(15), 1877–88. doi:10.1016/j.yexcr.2012.05.005

Lin, Z., & Pu, W. T. (2014). Harnessing Hippo in the heart: Hippo/Yap signaling and applications to heart regeneration and rejuvenation. *Stem Cell Research*. doi:10.1016/j.scr.2014.04.010

Lin, Z., von Gise, A., Zhou, P., Gu, F., Ma, Q., Jiang, J., … Pu, W. T. (2014). Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circulation Research*, *115*(3), 354–63. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303632

Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., … Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(23), 10532–7. doi:10.1073/pnas.1004279107

Liu, C.-Y., Zha, Z.-Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., … Guan, K.-L. (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF{beta}-TrCP E3 ligase. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(48), 37159–69. doi:10.1074/jbc.M110.152942

Liu, H., Jiang, D., Chi, F., & Zhao, B. (2012). The Hippo pathway regulates stem cell proliferation, self-renewal, and differentiation. *Protein & Cell*, *3*(4), 291–304. doi:10.1007/s13238-012-2919-3

Liu, H., Mohamed, O., Dufort, D., & Wallace, V. a. (2003). Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *227*(3), 323–34. doi:10.1002/dvdy.10315

Liu, X., Yang, N., Figel, S. a, Wilson, K. E., Morrison, C. D., Gelman, I. H., & Zhang, J. (2013). PTPN14 interacts with and negatively regulates the oncogenic function of YAP. *Oncogene*, *32*(10), 1266–73. doi:10.1038/onc.2012.147

Liu, Y., Xin, Y., Ye, F., Wang, W., Lu, Q., Kaplan, H. J., & Dean, D. C. (2010). Taz-tead1 links cell-cell contact to zeb1 expression, proliferation, and dedifferentiation in retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *51*(7), 3372–8. doi:10.1167/iovs.09-4321

Liu-chittenden, Y., Huang, B., Shim, J. S., Chen, Q., Lee, S., Anders, R. A., … Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD – YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP, 1300–1305. doi:10.1101/gad.192856.112.1300

Livesey, F. J., & Cepko, C. L. (2001). Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nature Reviews. Neuroscience*, *2*(2), 109–18. doi:10.1038/35053522

Locker, M., Agathocleous, M., Amato, M. a, Parain, K., Harris, W. a, & Perron, M. (2006). Hedgehog signaling and the retina: insights into the mechanisms controlling the proliferative properties of neural precursors. *Genes & Development*, *20*(21), 3036–48. doi:10.1101/gad.391106

Longobardi, E., Iotti, G., Di Rosa, P., Mejetta, S., Bianchi, F., Fernandez-Diaz, L. C., … Blasi, F. (2010). Prep1 (pKnox1)-deficiency leads to spontaneous tumor development in mice and accelerates EmuMyc lymphomagenesis: a tumor suppressor role for Prep1. *Molecular Oncology*, *4*(2), 126–34. doi:10.1016/j.molonc.2010.01.001

Longobardi, E., Penkov, D., Mateos, D., De Florian, G., Torres, M., & Blasi, F. (2014). Biochemistry of the tale transcription factors PREP, MEIS, and PBX in vertebrates. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *243*(1), 59–75. doi:10.1002/dvdy.24016

Lord-Grignon, J., Abdouh, M., & Bernier, G. (2006). Identification of genes expressed in retinal progenitor/stem cell colonies isolated from the ocular ciliary body of adult mice. *Gene Expression Patterns : GEP*, *6*(8), 992–9. doi:10.1016/j.modgep.2006.04.003

Low, B. C., Pan, C. Q., Shivashankar, G. V, Bershadsky, A., Sudol, M., & Sheetz, M. (2014). YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth. *FEBS Letters*, *588*(16), 2663–2670. doi:10.1016/j.febslet.2014.04.012

Lu, L., Li, Y., Kim, S. M., Bossuyt, W., Liu, P., Qiu, Q., … Johnson, R. L. (2010). Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(4), 1437–42. doi:10.1073/pnas.0911427107

M

MacNeil, A., Pearson, R. a, MacLaren, R. E., Smith, A. J., Sowden, J. C., & Ali, R. R. (2007). Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *25*(10), 2430–8. doi:10.1634/stemcells.2007-0035

Mahoney, W. M., Hong, J.-H., Yaffe, M. B., & Farrance, I. K. G. (2005). The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *The Biochemical Journal*, *388*(Pt 1), 217–25. doi:10.1042/BJ20041434

Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., … Kurihara, H. (2008). Multiple renal cysts , urinary concentration defects , and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ, 542–553. doi:10.1152/ajprenal.00201.2007.

Mao, Y., Rauskolb, C., Cho, E., Hu, W.-L., Hayter, H., Minihan, G., … Irvine, K. D. (2006). Dachs: an unconventional myosin that functions downstream of Fat to regulate growth, affinity and gene expression in Drosophila. *Development (Cambridge, England)*, *133*(13), 2539–51. doi:10.1242/dev.02427

Marquardt, T., & Gruss, P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends in Neurosciences*, *25*(1), 32–8. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801336

Martínez-Navarrete, G. C., Angulo, A., Martín-Nieto, J., & Cuenca, N. (2008). Gradual morphogenesis of retinal neurons in the peripheral retinal margin of adult monkeys and humans. *The Journal of Comparative Neurology*, *511*(4), 557–80. doi:10.1002/cne.21860

Masland, R. H. (2001). Neuronal diversity in the retina. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(4), 431–6. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502388

Matakatsu, H., & Blair, S. S. (2006). Separating the adhesive and signaling functions of the Fat and Dachsous protocadherins. *Development (Cambridge, England)*, *133*(12), 2315–24. doi:10.1242/dev.02401

Matsumoto, H., Murakami, Y., Kataoka, K., Lin, H., Connor, K. M., Miller, J. W., … Vavvas, D. G. (2014). Mammalian STE20-like kinase 2, not kinase 1, mediates photoreceptor cell death during retinal detachment. *Cell Death & Disease*, *5*(5), e1269. doi:10.1038/cddis.2014.218

Matsuoka, S., Ballif, B. a, Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., … Elledge, S. J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science (New York, N.Y.)*, *316*(5828), 1160–6. doi:10.1126/science.1140321

Mauviel, a, Nallet-Staub, F., & Varelas, X. (2012). Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene*, *31*(14), 1743–56. doi:10.1038/onc.2011.363

McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K., & Chen, C. S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Developmental Cell*, *6*(4), 483–95. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068789

McClatchey, a I., Saotome, I., Ramesh, V., Gusella, J. F., & Jacks, T. (1997). The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes & Development*, *11*(10), 1253–1265. doi:10.1101/gad.11.10.1253

McClatchey, A. I., & Giovannini, M. (2005). Membrane organization and tumorigenesis--the NF2 tumor suppressor, Merlin. *Genes & Development*, *19*(19), 2265–77. doi:10.1101/gad.1335605

McPherson, J. P., Tamblyn, L., Elia, A., Migon, E., Shehabeldin, A., Matysiak-Zablocki, E., … Hakem, R. (2004). Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *The EMBO Journal*, *23*(18), 3677–88. doi:10.1038/sj.emboj.7600371

Méchali, M., Yoshida, K., Coulombe, P., & Pasero, P. (2013). Genetic and epigenetic determinants of DNA replication origins, position and activation. *Current Opinion in Genetics & Development*, *23*(2), 124–31. doi:10.1016/j.gde.2013.02.010

Menéndez, J., Pérez-Garijo, A., Calleja, M., & Morata, G. (2010). A tumor-suppressing mechanism in Drosophila involving cell competition and the Hippo pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(33), 14651–6. doi:10.1073/pnas.1009376107

Micali, N., Ferrai, C., Fernandez-Diaz, L. C., Blasi, F., & Crippa, M. P. (2009). Prep1 directly regulates the intrinsic apoptotic pathway by controlling Bcl-XL levels. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(5), 1143–51. doi:10.1128/MCB.01273-08

Miesfeld, J. B., & Link, B. a. (2014). Establishment of transgenic lines to monitor and manipulate Yap/Taz-Tead activity in zebrafish reveals both evolutionarily conserved and divergent functions of the Hippo pathway. *Mechanisms of Development*, *133*(414), 177–188. doi:10.1016/j.mod.2014.02.003

Mikeladze-Dvali, T., Wernet, M. F., Pistillo, D., Mazzoni, E. O., Teleman, A. a, Chen, Y.-W., … Desplan, C. (2005). The growth regulators warts/lats and melted interact in a bistable loop to specify opposite fates in Drosophila R8 photoreceptors. *Cell*, *122*(5), 775–87. doi:10.1016/j.cell.2005.07.026

Miller, E., Yang, J., DeRan, M., Wu, C., Su, A. I., Bonamy, G. M. C., … Wu, X. (2012). Identification of serum-derived sphingosine-1-phosphate as a small molecule regulator of YAP. *Chemistry & Biology*, *19*(8), 955–62. doi:10.1016/j.chembiol.2012.07.005

Min, T. H., Kriebel, M., Hou, S., & Pera, E. M. (2011). The dual regulator Sufu integrates Hedgehog and Wnt signals in the early Xenopus embryo. *Developmental Biology*, *358*(1), 262–76. doi:10.1016/j.ydbio.2011.07.035

Mitashov, V. I. (1997). Retinal regeneration, *905*.

Miyake, A., & Araki, M. (2014). Retinal stem/progenitor cells in the ciliary marginal zone complete retinal regeneration: a study of retinal regeneration in a novel animal model. *Developmental Neurobiology*, *74*(7), 739–56. doi:10.1002/dneu.22169

Mo, J.-S., Park, H. W., & Guan, K.-L. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Reports*, *15*(6), 642–56. doi:10.15252/embr.201438638

Modica, L., Iotti, G., D'Avola, A., & Blasi, F. (2014). Prep1 (pKnox1) Regulates Mouse Embryonic HSC Cycling and Self-Renewal Affecting the Stat1-Sca1 IFN-Dependent Pathway. *PloS One*, *9*(9), e107916. doi:10.1371/journal.pone.0107916

Moore, K. B., Mood, K., Daar, I. O., & Moody, S. A. (2004). Morphogenetic Movements Underlying Eye Field between the FGF and ephrinB1 Signaling Pathways, *6*, 55–67.

Morin-kensicki, E. M., Boone, B. N., Stonebraker, J. R., Teed, J., Alb, J. G., Magnuson, T. R., … Howell, M. (2006). Defects in Yolk Sac Vasculogenesis , Chorioallantoic Fusion , and Embryonic Axis Elongation in Mice with Targeted Disruption of Yap65 Defects in Yolk Sac Vasculogenesis , Chorioallantoic Fusion , and Embryonic Axis Elongation in Mice with Targeted Disrupt. doi:10.1128/MCB.26.1.77

Morrison, H., Sherman, L. S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C. A., … Herrlich, P. (2001). The NF2 tumor suppressor gene product , merlin , mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44, *2*, 968–980. doi:10.1101/gad.189601.encodes

Morrow, E. M., Belliveau, M. J., & Cepko, C. L. (1998). Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(10), 3738–48. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9570804

Moshiri, A., McGuire, C. R., & Reh, T. a. (2005). Sonic hedgehog regulates proliferation of the retinal ciliary marginal zone in posthatch chicks. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *233*(1), 66–75. doi:10.1002/dvdy.20299

Moshiri, A., & Reh, T. a. (2004). Persistent progenitors at the retinal margin of ptc+/- mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *24*(1), 229–37. doi:10.1523/JNEUROSCI.2980-03.2004

Mullen, A. C. (2014). Hippo tips the TGF-β scale in favor of pluripotency. *Cell Stem Cell*, *14*(1), 6–8. doi:10.1016/j.stem.2013.12.009

Murakami, M., Nakagawa, M., Olson, E. N., & Nakagawa, O. (2005). A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(50), 18034–9. doi:10.1073/pnas.0509109102

Murakami, M., Tominaga, J., Makita, R., Uchijima, Y., Kurihara, Y., Nakagawa, O., … Kurihara, H. (2006). Transcriptional activity of Pax3 is co-activated by TAZ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *339*(2), 533–9. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.214

N

Nabeshima, A., Nishibayashi, C., Ueda, Y., Ogino, H., & Araki, M. (2013). Loss of cell-extracellular matrix interaction triggers retinal regeneration accompanied by Rax and Pax6 activation. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, *51*(6), 410–9. doi:10.1002/dvg.22378

Nallet-Staub, F., Marsaud, V., Li, L., Gilbert, C., Dodier, S., Bataille, V., … Mauviel, A. (2014). Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology*, *134*(1), 123–32. doi:10.1038/jid.2013.319

Negishi, K., Teranishi, T., & Kato, S. (1982). New dopaminergic and indoleamine-accumulating cells in the growth zone of goldfish retinas after neurotoxic destruction. *Science (New York, N.Y.)*, *216*(4547), 747–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7079736

Nejigane, S., Haramoto, Y., Okuno, M., Takahashi, S., & Asashima, M. (2011). The transcriptional coactivators Yap and TAZ are expressed during early Xenopus development. *The International Journal of Developmental Biology*, *55*(1), 121–6. doi:10.1387/ijdb.103130sn

Neto-Silva, R. M., de Beco, S., & Johnston, L. a. (2010). Evidence for a growth-stabilizing regulatory feedback mechanism between Myc and Yorkie, the Drosophila homolog of Yap. *Developmental Cell*, *19*(4), 507–20. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.009

Nickerson, P. E. B., Emsley, J. G., Myers, T., & Clarke, D. B. (2007). Proliferation and expression of progenitor and mature retinal phenotypes in the adult mammalian ciliary body after retinal ganglion cell injury. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *48*(11), 5266–75. doi:10.1167/iovs.07-0167

Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., … Sasaki, H. (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Developmental Cell*, *16*(3), 398–410. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.003

Nowakowski, R. S., Lewin, S. B., & Miller, M. W. (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytology*, *18*(3), 311–8.

O

Oh, H. (2009). NIH Public Access, *28*(17), 1916–1927. doi:10.1038/onc.2009.43.In

Oh, H., & Irvine, K. D. (2008). In vivo regulation of Yorkie phosphorylation and localization. *Development (Cambridge, England)*, *135*(6), 1081–8. doi:10.1242/dev.015255

Oh, H. J., Kim, M. J., Song, S. J., Kim, T., Lee, D., Kwon, S.-H., … Lim, D.-S. (2010). MST1 limits the kinase activity of aurora B to promote stable kinetochore-microtubule attachment. *Current Biology : CB*, *20*(5), 416–22. doi:10.1016/j.cub.2009.12.054

Oh, H., Reddy, B. V. V. G., & Irvine, K. D. (2009). Phosphorylation-independent repression of Yorkie in Fat-Hippo signaling. *Developmental Biology*, *335*(1), 188–97. doi:10.1016/j.ydbio.2009.08.026

Oh, S., Lee, D., Kim, T., Kim, T.-S., Oh, H. J., Hwang, C. Y., … Lim, D.-S. (2009). Crucial role for Mst1 and Mst2 kinases in early embryonic development of the mouse. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(23), 6309–20. doi:10.1128/MCB.00551-09

Oh, Hyangyee, I. K. D. (2011). NIH Public Access, *337*(2), 303–312. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.046.Hippo

Ohashi, K., & Mizuno, K. (2014). A novel pair of split venus fragments to detect protein-protein interactions by in vitro and in vivo bimolecular fluorescence complementation assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1174*, 247–62. doi:10.1007/978-1-4939-0944-5_17

Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., … Sudol, M. (2010). Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *The Biochemical Journal*, *432*(3), 461–72. doi:10.1042/BJ20100870

Omerovic, J., Puggioni, E. M. R., Napoletano, S., Visco, V., Fraioli, R., Frati, L., … Alimandi, M. (2004). Ligand-regulated association of ErbB-4 to the transcriptional co-activator YAP65 controls transcription at the nuclear level. *Experimental Cell Research*, *294*(2), 469–79. doi:10.1016/j.yexcr.2003.12.002

Ooto, S., Akagi, T., Kageyama, R., Akita, J., Mandai, M., Honda, Y., & Takahashi, M. (2004). Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(37), 13654–9. doi:10.1073/pnas.0402129101

Osakada, F., Ooto, S., Akagi, T., Mandai, M., Akaike, A., & Takahashi, M. (2007). Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(15), 4210–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.4193-06.2007

Ota, M., & Sasaki, H. (2008). Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development (Cambridge, England)*, *135*(24), 4059–69. doi:10.1242/dev.027151

Otteson, D. C., & Hitchcock, P. F. (2003). Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Research*, *43*(8), 927–936. doi:10.1016/S0042-6989(02)00400-5

Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G. a, Muir, B., Li, W., Sgroi, D. C., … Haber, D. a. (2006). Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(33), 12405–10. doi:10.1073/pnas.0605579103

P

Pan, D. (2010a). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*, *19*(4), 491–505. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011

Pan, D. (2010b). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*, *19*(4), 491–505. doi:10.1016/j.devcel.2010.09.011

Pantalacci, S., Tapon, N., & Léopold, P. (2003). The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in Drosophila. *Nature Cell Biology*, *5*(10), 921–7. doi:10.1038/ncb1051

Papizan, J. B., & Olson, E. N. (2014). Hippo in the path to heart repair. *Circulation Research*, *115*(3), 332–4. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.304389

Parain, K., Mazurier, N., Bronchain, O., Borday, C., Cabochette, P., Chesneau, A., … Perron, M. (2012). A large scale screen for neural stem cell markers in Xenopus retina. *Developmental Neurobiology*, *72*(4), 491–506.

Parain, K., Mazurier, N., Bronchain, O., Borday, C., Cabochette, P., Chesneau, A., … Perron, M. (2012). A large scale screen for neural stem cell markers in Xenopus retina. *Developmental Neurobiology*, *72*(4), 491–506. doi:10.1002/dneu.20973

Paramasivam, M., Sarkeshik, A., Yates, J. R., Fernandes, M. J. G., & McCollum, D. (2011). Angiomotin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(19), 3725–33. doi:10.1091/mbc.E11-04-0300

Park, K.-S., Whitsett, J. a, Di Palma, T., Hong, J.-H., Yaffe, M. B., & Zannini, M. (2004). TAZ interacts with TTF-1 and regulates expression of surfactant protein-C. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(17), 17384–90. doi:10.1074/jbc.M312569200

Pellissier, L. P., Alves, C. H., Quinn, P. M., Vos, R. M., Tanimoto, N., Lundvig, D. M. S., … Wijnholds, J. (2013). Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis. *PLoS Genetics*, *9*(12), e1003976. doi:10.1371/journal.pgen.1003976

Pellock, B. J., Buff, E., White, K., & Hariharan, I. K. (2007). The Drosophila tumor suppressors Expanded and Merlin differentially regulate cell cycle exit, apoptosis, and Wingless signaling. *Developmental Biology*, *304*(1), 102–15. doi:10.1016/j.ydbio.2006.12.021

Peng, H. W., Slattery, M., & Mann, R. S. (2009a). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the Drosophila eye imaginal disc. *Genes & Development*, *23*(19), 2307–19. doi:10.1101/gad.1820009

Peng, H. W., Slattery, M., & Mann, R. S. (2009b). Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA bantam in the progenitor domain of the Drosophila eye imaginal disc. *Genes & Development*, *23*(19), 2307–19. doi:10.1101/gad.1820009

Perron, M. (2003). A novel function for Hedgehog signalling in retinal pigment epithelium differentiation. *Development*, *130*(8), 1565–1577. doi:10.1242/dev.00391

Perron, M., & Harris, W. a. (2000). Retinal stem cells in vertebrates. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, *22*(8), 685–8. doi:10.1002/1521-1878(200008)22:8<685::AID-BIES1>3.0.CO;2-C

Perron, M., Kanekar, S., Vetter, M. L., & Harris, W. a. (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the Xenopus eye. *Developmental Biology*, *199*(2), 185–200. doi:10.1006/dbio.1998.8939

Petrova, R., Garcia, a D. R., & Joyner, A. L. (2013). Titration of GLI3 repressor activity by sonic hedgehog signaling is critical for maintaining multiple adult neural stem cell and astrocyte

functions. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(44), 17490–505. doi:10.1523/JNEUROSCI.2042-13.2013

Piccolo, S., Dupont, S., Cordenonsi, M. (2014). The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond. *Physiological reviews, 94(4)*: 1287-1312.

Polesello, C., Huelsmann, S., Brown, N. H., & Tapon, N. (2006). The Drosophila RASSF homolog antagonizes the hippo pathway. *Current Biology : CB*, *16*(24), 2459–65. doi:10.1016/j.cub.2006.10.060

Pollak, J., Wilken, M. S., Ueki, Y., Cox, K. E., Sullivan, J. M., Taylor, R. J., … Reh, T. a. (2013). ASCL1 reprograms mouse Muller glia into neurogenic retinal progenitors. *Development (Cambridge, England)*, *140*(12), 2619–31. doi:10.1242/dev.091355

Porrello, E. R., Mahmoud, A. I., Simpson, E., Hill, J. a, Richardson, J. a, Olson, E. N., & Sadek, H. a. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6020), 1078–80. doi:10.1126/science.1200708

Praskova, M., Xia, F., & Avruch, J. (2008). MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Current Biology : CB*, *18*(5), 311–21. doi:10.1016/j.cub.2008.02.006

Pusapati, R. V, Rounbehler, R. J., Hong, S., Powers, J. T., Yan, M., Kiguchi, K., … Johnson, D. G. (2006). ATM promotes apoptosis and suppresses tumorigenesis in response to Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(5), 1446–51. doi:10.1073/pnas.0507367103

Q

Quastler, H., & Sherman, F. G. (1959). Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Experimental Cell Research*, *17*(3), 420–38.

R

Ramachandran, Zhao, G. (2013). NIH Public Access, *14*(10), 1013–1023. doi:10.1038/ncb2586.Insm1a-mediated

Ramos, A., & Camargo, F. D. (2012). The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends in Cell Biology*, *22*(7), 339–46. doi:10.1016/j.tcb.2012.04.006

Raymond, P. a, Barthel, L. K., Bernardos, R. L., & Perkowski, J. J. (2006). Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Developmental Biology*, *6*, 36. doi:10.1186/1471-213X-6-36

Reh, T. a. (1987). Cell-specific regulation of neuronal production in the larval frog retina. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *7*(10), 3317–24. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3499488

Reh, T. a, & Tully, T. (1986). Regulation of tyrosine hydroxylase-containing amacrine cell number in larval frog retina. *Developmental Biology*, *114*(2), 463–9. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2869994

Reh, T. a, & Constantine-Paton M. (1983). Qualitative and quantitative measures of plasticity during the normal development of the Rana pipiens retinotectal projection. Brain research, 312(2), 187-200.

Reh, T. a, Jones M., Pittack C. (1991). Common mechanisms of retinal regeneration in the larval frog and embryonic chick. *Ciba Foundation symposium*, 160, 192-204.

Reimann, M., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Schildhauer, I., Teichmann, B., Stein, H., … Schmitt, C. a. (2007). The Myc-evoked DNA damage response accounts for treatment resistance in primary lymphomas in vivo. *Blood*, *110*(8), 2996–3004. doi:10.1182/blood-2007-02-075614

Ren, F., Wang, B., Yue, T., Yun, E.-Y., Ip, Y. T., & Jiang, J. (2010). Hippo signaling regulates Drosophila intestine stem cell proliferation through multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(49), 21064–9. doi:10.1073/pnas.1012759107

Ren, F., Zhang, L., & Jiang, J. (2010). Hippo signaling regulates Yorkie nuclear localization and activity through 14-3-3 dependent and independent mechanisms. *Developmental Biology*, *337*(2), 303–12. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.046

Ribeiro, P., Holder, M., Frith, D., Snijders, A. P., & Tapon, N. (2014). Crumbs promotes expanded recognition and degradation by the SCF(Slimb/β-TrCP) ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(19), E1980–9. doi:10.1073/pnas.1315508111

Rikhof, H., Chang, H., Haffter, P., Kimmel, C. B., Moens, C. B., Krebsforschungszentrum, D., & Tu, D.-. (2000). lazarus Is a Novel pbx Gene that Globally Mediates hox Gene Function in Zebrafish, *6*, 255–267.

Risolino, M., Mandia, N., Iavarone, F., Dardaei, L., Longobardi, E., Fernandez, S., … Verde, P. (2014). Transcription factor PREP1 induces EMT and metastasis by controlling the TGF-β-SMAD3 pathway in non-small cell lung adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(36), E3775–84. doi:10.1073/pnas.1407074111

Robinson, B. S., Huang, J., Hong, Y., & Moberg, K. H. (2010). Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in Drosophila via the FERM-domain protein Expanded. *Current Biology : CB*, *20*(7), 582–90. doi:10.1016/j.cub.2010.03.019

Robinson, K., Asawachaicharn, N., Galloway, D. a, & Grandori, C. (2009). c-Myc accelerates S-phase and requires WRN to avoid replication stress. *PloS One*, *4*(6), e5951. doi:10.1371/journal.pone.0005951

Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A. G., Li, X., Neal, J. T., Schafer, E. J., … Hahn, W. C. (2012). β-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*, *151*(7), 1457–73. doi:10.1016/j.cell.2012.11.026

S

Saint-Geniez, M., & D'Amore, P. a. (2004). Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *The International Journal of Developmental Biology*, *48*(8-9), 1045–58. doi:10.1387/ijdb.041895ms

Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K.-I., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H., & Halder, G. (2011). Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *The EMBO Journal*, *30*(12), 2325–35. doi:10.1038/emboj.2011.157

Scheel, H., & Hofmann, K. (2003). A novel interaction motif, SARAH, connects three classes of tumor suppressor. *Current Biology : CB*, *13*(23), R899–900. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14654011

Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszak, J., Rodriguez, J. R., Zhou, D., … Camargo, F. D. (2011). Yap1 acts downstream of α-catenin to control epidermal proliferation. *Cell*, *144*(5), 782–95. doi:10.1016/j.cell.2011.02.031

Schroeder, M. C., & Halder, G. (2012). Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(7), 803–11. doi:10.1016/j.semcdb.2012.06.001

Schütte, U., Bisht, S., Heukamp, L., C., Kebschull, M., Florin, A., Haarmann, J., Hoffmann, P., Bendas, G., Buettner, R., Brossart, P., Feldmann, G. (2014). Hippo signaling mediates proliferation, invasiveness, and metastatic potential of clear cell renal cell carcinoma. *Translational oncology 7(2)*, 309-21. doi: 10.1016/j.tranon.2014.02.005

Seidel C., Schagdarsurengin U., Blümke K., Würl P., Pfeifer G. P., Hauptmann S., Taubert H., Dammann R. (2007). Frequent hypermethylation of MST1 and MST2 in soft tissue sarcoma. *Molecular carcinogenesis*, 46(10), 865-71.

Shaw, R. L., Kohlmaier, A., Polesello, C., Veelken, C., Edgar, B. a, & Tapon, N. (2010). The Hippo pathway regulates intestinal stem cell proliferation during Drosophila adult midgut

regeneration. *Development (Cambridge, England)*, *137*(24), 4147–58. doi:10.1242/dev.052506

Shimizu, T., Ho, L.-L., & Lai, Z.-C. (2008). The mob as tumor suppressor gene is essential for early development and regulates tissue growth in Drosophila. *Genetics*, *178*(2), 957–65. doi:10.1534/genetics.107.081570

Silva, E., Tsatskis, Y., Gardano, L., Tapon, N., & McNeill, H. (2006). The tumor-suppressor gene fat controls tissue growth upstream of expanded in the hippo signaling pathway. *Current Biology : CB*, *16*(21), 2081–9. doi:10.1016/j.cub.2006.09.004

Silvis, M. R., Kreger, B. T., Lien, W., Klezovitch, O., Marianna, G., Camargo, F. D., … Seykora, J. T. (2012). NIH Public Access, *4*(174), 1–18. doi:10.1126/scisignal.2001823.

Singhal, S., Bhatia, B., Jayaram, H., Becker, S., Jones, M. F., Cottrill, P. B., … Limb, G. A. (2012). Human Müller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors in vitro and partially restore RGC function in vivo following transplantation. *Stem Cells Translational Medicine*, *1*(3), 188–99. doi:10.5966/sctm.2011-0005

Solovei, I., Schermelleh, L., Albiez, H., & Cremer, T. (2006). *Chapter 35 – Detection of Cell Cycle Stages in situ in Growing Cell Populations. Cell Biology (Third Edition). A Laboratory Handbook*. *Cell Biology* (Vol. 1, pp. 291–299). Elsevier. doi:10.1016/B978-012164730-8/50036-8

Song, H., Mak, K. K., Topol, L., Yun, K., Hu, J., Garrett, L., … Yang, Y. (2010). Mammalian Mst1 and Mst2 kinases play essential roles in organ size control and tumor suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(4), 1431–6. doi:10.1073/pnas.0911409107

Song, J. Y., Park, R., Kim, J. Y., Hughes, L., Lu, L., Kim, S., … Cho, S.-H. (2014). Dual function of Yap in the regulation of lens progenitor cells and cellular polarity. *Developmental Biology*, *386*(2), 281–90. doi:10.1016/j.ydbio.2013.12.037

Srinivasan, S. V, Dominguez-Sola, D., Wang, L. C., Hyrien, O., & Gautier, J. (2013). Cdc45 is a critical effector of myc-dependent DNA replication stress. *Cell Reports*, *3*(5), 1629–39. doi:10.1016/j.celrep.2013.04.002

Staley, B. K., & Irvine, K. D. (2010). Warts and Yorkie mediate intestinal regeneration by influencing stem cell proliferation. *Current Biology : CB*, *20*(17), 1580–7. doi:10.1016/j.cub.2010.07.041

Steinhardt, A. a, Gayyed, M. F., Klein, A. P., Dong, J., Maitra, A., Pan, D., … Anders, R. a. (2008). Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Human Pathology*, *39*(11), 1582–9. doi:10.1016/j.humpath.2008.04.012

Stenkamp, D. L., Powers, M. K., Carney, L. H., & Cameron, D. a. (2001). Evidence for two distinct mechanisms of neurogenesis and cellular pattern formation in regenerated goldfish retinas. *The Journal of Comparative Neurology*, *431*(4), 363–81. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223808

Stocker, H. (2011). Growth control: Myc and Yorkie get connected. Current biology, 21(1), R37-9. doi: 10.1016/j.cub.2010.11.057

Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, a, … Blandino, G. (2001). Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(18), 15164–73. doi:10.1074/jbc.M010484200

Straznicky, K., & Gaze, R. M. (1971). The growth of the retina in Xenopus laevis: an autoradiographic study. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *26*(1), 67–79. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5039211

Sudol, M. (2013). YAP1 oncogene and its eight isoforms. *Oncogene*, *32*(33), 3922. doi:10.1038/onc.2012.520

Sudol, M., Shields, D. C., & Farooq, A. (2012). Structures of YAP protein domains reveal promising targets for development of new cancer drugs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(7), 827–33. doi:10.1016/j.semcdb.2012.05.002

Sudol, Marius, Peer Bork, Aaron Einbond, K. K. (1995). Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain.

Sudol M. (1994). Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene*, 9(8), 2145-52.

Sun, G., Asami, M., Ohta, H., Kosaka, J., & Kosaka, M. (2006). Retinal stem/progenitor properties of iris pigment epithelial cells. *Developmental Biology*, *289*(1), 243–52. doi:10.1016/j.ydbio.2005.10.035

Svärd, J., Heby-Henricson, K., Henricson, K. H., Persson-Lek, M., Rozell, B., Lauth, M., … Teglund, S. (2006). Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Developmental Cell*, *10*(2), 187–97. doi:10.1016/j.devcel.2005.12.013

T

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024

Takeda, M., Takamiya, A., Jiao, J.-W., Cho, K.-S., Trevino, S. G., Matsuda, T., & Chen, D. F. (2008). alpha-Aminoadipate induces progenitor cell properties of Müller glia in adult mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *49*(3), 1142–50. doi:10.1167/iovs.07-0434

Tallafuss, A., Gibson, D., Morcos, P., Li, Y., Seredick, S., Eisen, J., & Washbourne, P. (2012). Turning gene function ON and OFF using sense and antisense photo-morpholinos in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, *139*(9), 1691–9. doi:10.1242/dev.072702

Tamm, C., Böwer, N., & Annerén, C. (2011). Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *Journal of Cell Science*, *124*(Pt 7), 1136–44. doi:10.1242/jcs.075796

Tao, W., Zhang, S., Turenchalk, G. S., Stewart, R. a, St John, M. a, Chen, W., & Xu, T. (1999). Human homologue of the Drosophila melanogaster lats tumour suppressor modulates CDC2 activity. *Nature Genetics*, *21*(2), 177–81. doi:10.1038/5960

Tapon, N., Harvey, K. F., Bell, D. W., Wahrer, D. C. R., Schiripo, T. a, Haber, D. a, & Hariharan, I. K. (2002). salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*, *110*(4), 467–78. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12202036

Tariki, M., Dhanyamraju, P. K., Fendrich, V., Borggrefe, T., Feldmann, G., & Lauth, M. (2014). The Yes-associated protein controls the cell density regulation of Hedgehog signaling. *Oncogenesis*, *3*(8), e112. doi:10.1038/oncsis.2014.27

Taylor, M. D., Liu, L., Raffel, C., Hui, C., Mainprize, T. G., Zhang, X., … Hogg, D. (2002). Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nature Genetics*, *31*(3), 306–10. doi:10.1038/ng916

Thi, H., Sekkali, B., Imschoot, G. Van, Janssens, S., & Vleminckx, K. (2010). Wnt / β -catenin signaling is involved in the induction and maintenance of primitive hematopoiesis in the vertebrate embryo. doi:10.1073/pnas.1007725107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1007725107

Tian, Y., Kolb, R., Hong, J.-H., Carroll, J., Li, D., You, J., … Benjamin, T. (2007). TAZ promotes PC2 degradation through a SCFbeta-Trcp E3 ligase complex. *Molecular and Cellular Biology*, *27*(18), 6383–95. doi:10.1128/MCB.00254-07

Tremblay, A. M., & Camargo, F. D. (2012). Hippo signaling in mammalian stem cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *23*(7), 818–26. doi:10.1016/j.semcdb.2012.08.001

Tropepe, V. (2000). Retinal Stem Cells in the Adult Mammalian Eye. *Science*, *287*(5460), 2032–2036. doi:10.1126/science.287.5460.2032

Tsai, B. P., Hoverter, N. P., & Waterman, M. L. (2012). Blending hippo and WNT: sharing messengers and regulation. *Cell*, *151*(7), 1401–3. doi:10.1016/j.cell.2012.12.007

Tsubouchi, T., & Fisher, A. G. (2013). *Reprogramming and the pluripotent stem cell cycle. Current topics in developmental biology* (1st ed., Vol. 104, pp. 223–41). Copyright © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved. doi:10.1016/B978-0-12-416027-9.00007-3

Tyler, D. M., & Baker, N. E. (2007). Expanded and fat regulate growth and differentiation in the Drosophila eye through multiple signaling pathways. *Developmental Biology*, *305*(1), 187–201. doi:10.1016/j.ydbio.2007.02.004

U

Udan, R. S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., & Halder, G. (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nature Cell Biology*, *5*(10), 914–20. doi:10.1038/ncb1050

Ulloa F., Marti E. (2010). Wnt won the war: antagonistic role of Wnt over Shh controls dorso-ventral patterning of the vertebrate neural tube. *Developmental dynamics*, 239(1), 69-76, doi: 10.1002/dvdy.22058

V

Van den Brink, G. R., Bleuming, S. a, Hardwick, J. C. H., Schepman, B. L., Offerhaus, G. J., Keller, J. J., … Peppelenbosch, M. P. (2004). Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nature Genetics*, *36*(3), 277–82. doi:10.1038/ng1304

Van Dop W. A., Uhmann A., Wijgerde M., Sleddens-Linkels E., Heijmans J., Offerhaus G. J., ...Van den Brink G. R. (2009). *Gastroenterology*, 136(7), 2195-2203, doi: 10.1053/j.gastro.2009.02.068

Van Hateren, N. J., Das, R. M., Hautbergue, G. M., Borycki, A.-G., Placzek, M., & Wilson, S. a. (2011). FatJ acts via the Hippo mediator Yap1 to restrict the size of neural progenitor cell pools. *Development (Cambridge, England)*, *138*(10), 1893–902. doi:10.1242/dev.064204

Varela-Nallar, L., & Inestrosa, N. C. (2013). Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(June), 100. doi:10.3389/fncel.2013.00100

Varelas, X. (2014). The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development (Cambridge, England)*, *141*(8), 1614–26. doi:10.1242/dev.102376

Varelas, X., Miller, B. W., Sopko, R., Song, S., Gregorieff, A., Fellouse, F. a, … Attisano, L. (2010). The Hippo pathway regulates Wnt/beta-catenin signaling. *Developmental Cell*, *18*(4), 579–91. doi:10.1016/j.devcel.2010.03.007

Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B. M., Dembowy, J., … Wrana, J. L. (2008). TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nature Cell Biology*, *10*(7), 837–48. doi:10.1038/ncb1748

Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B. G., … Wrana, J. L. (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-β-SMAD pathway. *Developmental Cell*, *19*(6), 831–44. doi:10.1016/j.devcel.2010.11.012

Varelas, X., & Wrana, J. L. (2012). Coordinating developmental signaling: novel roles for the Hippo pathway. *Trends in Cell Biology*, *22*(2), 88–96. doi:10.1016/j.tcb.2011.10.002

Varjosalo, M., Li, S.-P., & Taipale, J. (2006). Divergence of hedgehog signal transduction mechanism between Drosophila and mammals. *Developmental Cell*, *10*(2), 177–86. doi:10.1016/j.devcel.2005.12.014

Vassilev, a, Kaneko, K. J., Shu, H., Zhao, Y., & DePamphilis, M. L. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes & Development*, *15*(10), 1229–41. doi:10.1101/gad.888601

Visser-Grieve, S., Hao, Y., & Yang, X. (2012). Human homolog of Drosophila expanded, hEx, functions as a putative tumor suppressor in human cancer cell lines independently of the Hippo pathway. *Oncogene*, *31*(9), 1189–95. doi:10.1038/onc.2011.318

Von Gise, A., Lin, Z., Schlegelmilch, K., Honor, L. B., Pan, G. M., Buck, J. N., … Pu, W. T. (2012). YAP1, the nuclear target of Hippo signaling, stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(7), 2394–9. doi:10.1073/pnas.1116136109

Voorhoeve, P. M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J. M., Stoop, H., Nagel, R., … Agami, R. (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, *124*(6), 1169–81. doi:10.1016/j.cell.2006.02.037

Vossmerbaeumer, U., Kuehl, S., Kern, S., Kluter, H., Jonas, J. B., & Bieback, K. (2008). Induction of retinal pigment epithelium properties in ciliary margin progenitor cells. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, *36*(4), 358–66. doi:10.1111/j.1442-9071.2008.01770.x

W

Wackerhage, H., Del Re, D. P., Judson, R. N., Sudol, M., & Sadoshima, J. (2014). The Hippo signal transduction network in skeletal and cardiac muscle. *Science Signaling*, *7*(337), re4–re4. doi:10.1126/scisignal.2005096

Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., & Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development (Cambridge, England)*, *138*(18), 3907–14. doi:10.1242/dev.070987

Wan, J., Zheng, H., Chen, Z.-L., Xiao, H.-L., Shen, Z.-J., & Zhou, G.-M. (2008). Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Research*, *48*(2), 223–34. doi:10.1016/j.visres.2007.11.002

Wan, J., Zheng, H., Xiao, H.-L., She, Z.-J., & Zhou, G.-M. (2007). Sonic hedgehog promotes stem-cell potential of Müller glia in the mammalian retina. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *363*(2), 347–54. doi:10.1016/j.bbrc.2007.08.178

Wang, K., Degerny, C., Xu, M., & Yang, X.-J. (2009). YAP, TAZ, and Yorkie: a conserved family of signal-responsive transcriptional coregulators in animal development and human disease. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, *87*(1), 77–91. doi:10.1139/O08-114

Wang, W., Huang, J., & Chen, J. (2011a). Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4364–70. doi:10.1074/jbc.C110.205401

Wang, W., Huang, J., & Chen, J. (2011b). Angiomotin-like proteins associate with and negatively regulate YAP1. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(6), 4364–70. doi:10.1074/jbc.C110.205401

Wang, W., Huang, J., Wang, X., Yuan, J., Li, X., Feng, L., … Chen, J. (2012). PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. *Genes & Development*, *26*(17), 1959–71. doi:10.1101/gad.192955.112

Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews. Neuroscience*, *5*(10), 747–57. doi:10.1038/nrn1497

Watanabe, T., & Raff, M. C. (1990). Rod photoreceptor development in vitro: intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron*, *4*(3), 461–7. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2138470

Watanabe, Y., & Maekawa, M. (2010). Spatiotemporal regulation of DNA replication in the human genome and its association with genomic instability and disease. *Current Medicinal Chemistry*, *17*(3), 222–33.

Watt, K. I., Judson, R., Medlow, P., Reid, K., Kurth, T. B., Burniston, J. G., … Wackerhage, H. (2010). Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *393*(4), 619–24. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.034

Wehman, A. M., Staub, W., Meyers, J. R., Raymond, P. a, & Baier, H. (2005). Genetic dissection of the zebrafish retinal stem-cell compartment. *Developmental Biology*, *281*(1), 53–65. doi:10.1016/j.ydbio.2005.02.010

Wei, X., Shimizu, T., & Lai, Z.-C. (2007). Mob as tumor suppressor is activated by Hippo kinase for growth inhibition in Drosophila. *The EMBO Journal*, *26*(7), 1772–81. doi:10.1038/sj.emboj.7601630

Wetts, R., Serbedzija, G. N., & Fraser, S. E. (1989). Cell lineage analysis reveals multipotent precursors in the ciliary margin of the frog retina. *Developmental Biology*, *136*(1), 254–63. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2478403

Wielenga, V. J., Smits, R., Korinek, V., Smit, L., Kielman, M., Fodde, R., … Pals, S. T. (1999). Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *The American Journal of Pathology*, *154*(2), 515–23. doi:10.1016/S0002-9440(10)65297-2

Wiley, L. a, Dattilo, L. K., Kang, K. B., Giovannini, M., & Beebe, D. C. (2010). The tumor suppressor merlin is required for cell cycle exit, terminal differentiation, and cell polarity in the developing murine lens. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *51*(7), 3611–8. doi:10.1167/iovs.09-4371

Williamson, K. a, Rainger, J., Floyd, J. a B., Ansari, M., Meynert, A., Aldridge, K. V, … Fitzpatrick, D. R. (2014). Heterozygous loss-of-function mutations in YAP1 cause both isolated and syndromic optic fissure closure defects. *American Journal of Human Genetics*, *94*(2), 295–302. doi:10.1016/j.ajhg.2014.01.001

Wohl, S. G., Schmeer, C. W., & Isenmann, S. (2012). Neurogenic potential of stem/progenitor-like cells in the adult mammalian eye. *Progress in Retinal and Eye Research*, *31*(3), 213–42. doi:10.1016/j.preteyeres.2012.02.001

Wong, L. L., & Rapaport, D. H. (2009). Defining retinal progenitor cell competence in Xenopus laevis by clonal analysis. *Development (Cambridge, England)*, *136*(10), 1707–15. doi:10.1242/dev.027607

Wu, D. M., Schneiderman, T., Burgett, J., Gokhale, P., Barthel, L., & Raymond, P. a. (2001). Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *42*(9), 2115–24. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481280

Wu, S., Huang, J., Dong, J., & Pan, D. (2003). hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell*, *114*(4), 445–56. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12941273

Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., & Pan, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Developmental Cell*, *14*(3), 388–98. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.007

X

Xia, H., Qi, H., Li, Y., Pei, J., Barton, J., Blackstad, M., … Tao, W. (2002). LATS1 tumor suppressor regulates G2 / M transition and apoptosis. doi:10.1038/sj/onc/1205174

Xiao, W., Wang, J., Ou, C., Zhang, Y., Ma, L., Weng, W., Pan, Q., Sun, F. (2013). Mutual interaction between YAP and c-Myc is critical for carcinogenesis in liver cancer. *Biochemical and biophysical research communications, 439(2)*, 167-72. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.08.071

Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L. B., Murakami, M., Qi, X., McAnally, J., … Olson, E. N. (2013). Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(34), 13839–44. doi:10.1073/pnas.1313192110

Xin, M., Kim, Y., Sutherland, L. B., Qi, X., Mcanally, J., Robert, J., … Olson, E. N. (2012). NIH Public Access, *4*(196), 1–15. doi:10.1126/scisignal.2002278.Regulation

Xu, M. Z., Chan, S. W., Liu, a M., Wong, K. F., Fan, S. T., Chen, J., … Luk, J. M. (2011). AXL receptor kinase is a mediator of YAP-dependent oncogenic functions in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, *30*(10), 1229–40. doi:10.1038/onc.2010.504

Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. a, & Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. *Development (Cambridge, England)*, *121*(4), 1053–63. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7743921

Xue, X. Y., & Harris, W. a. (2011). Using myc genes to search for stem cells in the ciliary margin of the Xenopus retina. *Developmental Neurobiology*. doi:10.1002/dneu.20887

Xue, X. Y., & Harris, W. a. (2012). Using myc genes to search for stem cells in the ciliary margin of the Xenopus retina. *Developmental Neurobiology*, *72*(4), 475–90. doi:10.1002/dneu.20887

Y

Yabuta, N., Okada, N., Ito, A., Hosomi, T., Nishihara, S., Sasayama, Y., … Nojima, H. (2007). Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(26), 19259–71. doi:10.1074/jbc.M608562200

Yagi, R., Chen, L. F., Shigesada, K., Murakami, Y., & Ito, Y. (1999). A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *The EMBO Journal*, *18*(9), 2551–62. doi:10.1093/emboj/18.9.2551

Yamazaki, S., Hayano, M., & Masai, H. (2013). Replication timing regulation of eukaryotic replicons: Rif1 as a global regulator of replication timing. *Trends in Genetics : TIG*, *29*(8), 449–60. doi:10.1016/j.tig.2013.05.001

Yao, M., Wang, Y., Zhang, P., Chen, H., Xu, Z., Jiao, J., & Yuan, Z. (2014). BMP2-SMAD Signaling Represses the Proliferation of Embryonic Neural Stem Cells through YAP. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *34*(36), 12039–48. doi:10.1523/JNEUROSCI.0486-14.2014

Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G. G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., … Camargo, F. D. (2014). Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell*, *157*(6), 1324–38. doi:10.1016/j.cell.2014.03.060

Yoshihama, Y., Sasaki, K., Horikoshi, Y., Suzuki, A., Ohtsuka, T., Hakuno, F., … Chida, K. (2011). KIBRA suppresses apical exocytosis through inhibition of aPKC kinase activity in epithelial cells. *Current Biology : CB*, *21*(8), 705–11. doi:10.1016/j.cub.2011.03.029

Yoshii, C., Ueda, Y., Okamoto, M., & Araki, M. (2007). Neural retinal regeneration in the anuran amphibian Xenopus laevis post-metamorphosis: transdifferentiation of retinal pigmented epithelium regenerates the neural retina. *Developmental Biology*, *303*(1), 45–56. doi:10.1016/j.ydbio.2006.11.024

Yu, F.-X., & Guan, K.-L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes & Development*, *27*(4), 355–71. doi:10.1101/gad.210773.112

Yu, F.-X., Meng, Z., Plouffe, S. W., & Guan, K.-L. (2014). Hippo Pathway Regulation of Gastrointestinal Tissues. *Annual Review of Physiology*, (September 2014), 1–27. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071733

Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., … Guan, K.-L. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, *150*(4), 780–91. doi:10.1016/j.cell.2012.06.037

Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W.-M., & Pan, D. (2010). Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Developmental Cell*, *18*(2), 288–99. doi:10.1016/j.devcel.2009.12.012

Yue, T., Tian, A., & Jiang, J. (2012). The cell adhesion molecule echinoid functions as a tumor suppressor and upstream regulator of the Hippo signaling pathway. *Developmental Cell*, *22*(2), 255–67. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.011

Z

Zaghloul, N. a, Yan, B., & Moody, S. a. (2005). Step-wise specification of retinal stem cells during normal embryogenesis. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, *97*(5), 321–37. doi:10.1042/BC20040521

Zaidi, S. K., Sullivan, A. J., Medina, R., Ito, Y., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., … Stein, G. S. (2004). Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription. *The EMBO Journal*, *23*(4), 790–9. doi:10.1038/sj.emboj.7600073

Zecca, M., & Struhl, G. (2010). A feed-forward circuit linking wingless, fat-dachsous signaling, and the warts-hippo pathway to Drosophila wing growth. *PLoS Biology*, *8*(6), e1000386. doi:10.1371/journal.pbio.1000386

Zhang, W., Nandakumar, N., Shi, Y., Manzano, M., Smith, A., Graham, G., ... Yi, C. (2014). Downstream of mutant KRAS, the transcription regulator YAP is essential for neoplastic progression to pancreatic ductal adenocarcinoma. *Science signaling, 7(324)*:ra42. doi: 10.1126/scisignal.2005049.

Zhang, H., Deo, M., Thompson, R. C., Uhler, M. D., & Turner, D. L. (2012). Negative regulation of Yap during neuronal differentiation. *Developmental Biology*, *361*(1), 103–15. doi:10.1016/j.ydbio.2011.10.017

Zhang, H., Liu, C.-Y., Zha, Z.-Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., … Guan, K.-L. (2009a). TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(20), 13355–62. doi:10.1074/jbc.M900843200

Zhang, H., Liu, C.-Y., Zha, Z.-Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., … Guan, K.-L. (2009b). TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(20), 13355–62. doi:10.1074/jbc.M900843200

Zhang, H., Pasolli, H. A., & Fuchs, E. (2011). Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(6), 2270–5. doi:10.1073/pnas.1019603108

Zhang, J., Ji, J.-Y., Yu, M., Overholtzer, M., Smolen, G. a, Wang, R., … Haber, D. a. (2009). YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nature Cell Biology*, *11*(12), 1444–50. doi:10.1038/ncb1993

Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., & Jiang, J. (2008). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Developmental Cell*, *14*(3), 377–87. doi:10.1016/j.devcel.2008.01.006

Zhang, N., Bai, H., David, K. K., Dong, J., Zheng, Y., Cai, J., … Pan, D. (2010). The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Developmental Cell*, *19*(1), 27–38. doi:10.1016/j.devcel.2010.06.015

Zhang, T., Zhou, Q., & Pignoni, F. (2011). Yki/YAP, Sd/TEAD and Hth/MEIS control tissue specification in the Drosophila eye disc epithelium. *PloS One*, *6*(7), e22278. doi:10.1371/journal.pone.0022278

Zhang W., Gao Y., Li P., Shi Z., Guo T., Li F., Han X., Feng Y., Zheng C., Wang Z., Li F., Chen H., Zhou Z., Zhang L., Ji H. (2014). VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell research*, 24(3), 331-43.

Zhao, B., & Guan, K.-L. (2014). Hippo Pathway Key to Ploidy Checkpoint. *Cell*, *158*(4), 695–696. doi:10.1016/j.cell.2014.07.041

Zhao, B., Lei, Q.-Y., & Guan, K.-L. (2009). Harness the power: new insights into the inhibition of YAP/Yorkie. *Developmental Cell*, *16*(3), 321–2. doi:10.1016/j.devcel.2009.02.015

Zhao, B., Li, L., Lei, Q., & Guan, K.-L. (2010). The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes & Development*, *24*(9), 862–74. doi:10.1101/gad.1909210

Zhao, B., Li, L., Lu, Q., Wang, L. H., Liu, C.-Y., Lei, Q., & Guan, K.-L. (2011). Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes & Development*, *25*(1), 51–63. doi:10.1101/gad.2000111

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.-Y., & Guan, K.-L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). *Genes & Development*, *24*(1), 72–85. doi:10.1101/gad.1843810

Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.-Y., Yu, J., & Guan, K.-L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & Development*, *26*(1), 54–68. doi:10.1101/gad.173435.111

Zhao, B., Tumaneng, K., & Guan, K.-L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nature Cell Biology*, *13*(8), 877–83. doi:10.1038/ncb2303

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., … Guan, K.-L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, *21*(21), 2747–61. doi:10.1101/gad.1602907

Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., … Guan, K.-L. (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Development*, *22*(14), 1962–71. doi:10.1101/gad.1664408

Zhao, X., Das, A. V, Soto-Leon, F., & Ahmad, I. (2005). Growth factor-responsive progenitors in the postnatal mammalian retina. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *232*(2), 349–58. doi:10.1002/dvdy.20290

Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., & Dawson, D. (2011). Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. doi:10.1073/pnas.1110428108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1110428108

Zhou, J. (2014). An emerging role for Hippo-YAP signaling in cardiovascular development. *Journal of Biomedical Research*, *28*(4), 251–4. doi:10.7555/JBR.28.20140020

Zink, D. (2006). The temporal program of DNA replication: new insights into old questions. *Chromosoma*, *115*(4), 273–87. doi:10.1007/s00412-006-0062-8

Ziosi, M., Baena-López, L. A., Grifoni, D., Froldi, F., Pession, A., Garoia, F., … Pession, A. (2010). dMyc functions downstream of Yorkie to promote the supercompetitive behavior of hippo pathway mutant cells. *PLoS Genetics*, *6*(9), e1001140. doi:10.1371/journal.pgen.1001140

Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G., & Harris, W. a. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development (Cambridge, England)*, *130*(21), 5155–67. doi:10.1242/dev.00723