



**HAL**  
open science

# Etude de la signalisation Hippo/YAP dans les cellules gliales de Müller en conditions physiologiques et pathologiques de dégénérescence rétinienne chez la souris

Annaïg Hamon

► **To cite this version:**

Annaïg Hamon. Etude de la signalisation Hippo/YAP dans les cellules gliales de Müller en conditions physiologiques et pathologiques de dégénérescence rétinienne chez la souris. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT: 2017SACLS558 . tel-01713338

**HAL Id: tel-01713338**

**<https://theses.hal.science/tel-01713338>**

Submitted on 20 Feb 2018

**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.

## Etude de la signalisation Hippo/YAP dans les cellules gliales de Müller en conditions physiologiques et pathologiques de dégénérescence rétinienne chez la souris

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay  
UMR9197

École doctorale n°568 BIOSIGNE  
Spécialité de doctorat: sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Orsay, le 19 décembre 2017, par

**Annaïg Hamon**

Composition du Jury :

Pr. Sébastien Bloyer	Président
Dr. Olivier Goureau	Rapporteur
Dr. Patrick Blader	Rapporteur
Dr. Sigolène Meilhac	Examinatrice
Dr. Alvaro Rendon	Examineur
Dr. Muriel Perron	Directrice de thèse



## Remerciements

Je tiens à commencer par remercier chaleureusement Muriel Perron ma directrice de thèse. Je te suis très reconnaissante de m'avoir accueillie dans ton équipe, de m'avoir accordé ta confiance et d'avoir toujours été disponible pour moi. Cela a toujours été un grand plaisir de parler sciences et de travailler avec toi.

Je tiens à remercier l'Association Retina France qui a financé mes trois premières années de thèse. Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers le président de l'association, Monsieur Moser ainsi que tous les adhérents. Je remercie également la Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer qui a financé ma quatrième année de thèse. Je souhaite également remercier l'Association Retina France et la Fondation Valentin Haüy pour leur financement des projets de recherche du laboratoire.

Je souhaite remercier Sébastien Bloyer qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse. J'aimerais également exprimer ma reconnaissance à Olivier Goureau et Patrick Blader qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je tiens aussi à remercier Sigolène Meilhac et Alvaro Rendon pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je tiens à remercier, Aurélie, Sarah, Julia, Rachida, Vincent, Boris et Franck avec qui j'ai effectué mon Master 2. Je vous suis très reconnaissante de tout ce que vous m'avez appris pendant l'année que j'ai passée avec vous.

Je souhaite également dire un grand merci aux voisins du dessous : Nathalie, Kévin, Véro, Sandrine et Jean-Vianney. Vous avez toujours été présents quand j'avais besoin de vous, super sympas et généreux alors vraiment merci !

Un grand merci également à tous les soigneurs animaliers qui s'occupent de mes petites bêtes et tout particulièrement à Krystal, Valérie et Xavier.

Ensuite, je tiens bien sûr à remercier tous les membres de l'équipe, anciens et présents, qui par leur présence et leur bienveillance ont fait que c'était un plaisir de venir travailler tous les jours pendant ces quatre années.

Plus personnellement, en commençant par le premier bureau, je remercie Odile (pour ta bienveillance et tes conseils), Morgane (c'est toujours très enrichissant et agréable de discuter avec toi) et mon deuxième boss, j'ai nommé JR. Jérôme, merci d'avoir toujours été disponible quand j'avais besoin de tes conseils pratiques ou théoriques ou même d'un bioinformaticien. Ton aide a été précieuse pour l'avancée de ce projet de recherche.

Dans le bureau qui suit, je souhaite remercier Tatiana (pour ses encouragements), Alicia (toujours sympa et souriante !) et Divya. Sans oublier Diana, ça a été un plaisir de t'encadrer et de travailler avec toi pendant ton M2. Je suis ravie et fière (je dois l'avouer) que tu restes avec nous pour ta thèse.

Dans le bureau d'en face, je commence par le seul homme : Albert, merci pour ta gentillesse, ta simplicité et nos longues discussions. Et aussi, merci de m'avoir fait apprécier les grenouilles au point que j'en adopte trois. J'ai d'ailleurs au passage une petite pensée pour feu Belle et je fais un gros bisou à Gaston et Bête (Beurk !). Du côté des filles, je remercie Sophie et Elodie. C'est toujours très agréable de travailler et bavarder avec vous. Et aussi bien sûr, Christel, merci d'avoir été là depuis le début pour me former et m'aider. Ta bienveillance, ton aide, tes conseils et tes encouragements ont été très précieux.

Je passe à mes colocs de bureau en commençant par remercier Pauline et Rahul qui sont partis chercher ailleurs (j'espère que vous trouvez...). Rodrigo, muchas gracias mi amigo ! Et ma petite Elena, merci pour tout. Je suis contente d'avoir partagé ces années avec toi et je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse.



Juliette et Karine, vous avez cru que je vous avais oublié ? Je vous réserve juste un sort particulier... Ma Karine, je ne sais même pas quoi te dire tellement il y a de choses pour lesquelles je dois te remercier. Merci pour tes conseils précieux niveau manip, merci pour ton soutien, pour nos « pauses thé » et nos « chocolate time », pour nos papotages, pour nos délires (je suis toujours du côté obscur de la force), merci pour tout en fait, merci d'être mon amie. Juliette, je te remercie pour tout également. Aussi bien scientifiquement qu'humainement, tu as été un vrai pilier pour moi (ce n'est vraiment pas beau comme mot « pilier » mais ça représente bien le truc je trouve). Nous avons débuté ensemble au labo et ça aurait vraiment été moins bien et plus difficile sans toi. Et en plus t'es ma copine (comme dirait Karine) alors vraiment je te remercie du fond du cœur.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner toutes les personnes qui m'ont accompagnée et soutenue pendant ces années. Je pense à tous mes amis d'ici et du Kreiz Breizh qui ont toujours été là pour moi. Je veux remercier tout particulièrement ma deuxième famille Claire, Erwan et Baguette. Merci pour toutes ces soirées et ces week-ends passés avec vous à manger, boire, jouer et rigoler. Merci aussi pour votre indéfectible soutien. Je remercie également ma belle-famille pour son soutien. Les mises au vert à Champsecret sont toujours un plaisir. Je voudrais aussi remercier mes sœurs et mon beauf : Rozenn, Gildas, Maïwenn et Klervi. Les filles, vous êtes les meilleures sœurs du monde ! Et aussi, merci d'avoir chanté pour Retina France. Et puis, spéciale dédicace à Klervi qui commence sa thèse. A ton tour !! Je compte sur toi pour nous sauver de la submersion littorale ! Je tiens également à remercier mes parents qui m'ont toujours fait confiance, encouragés et soutenus dans mes choix pendant ses longues études. Merci de m'avoir permis de faire ce que je voulais ! Et pour finir (car on garde toujours le meilleur pour la fin), mes derniers remerciements vont à Alexandre. Je crois que je n'ai pas besoin de m'étendre, tu sais à quel point je te suis reconnaissante de tout ce que tu m'apportes dans la vie.



## RESUME

Les maladies dégénératives de la rétine sont une des causes principales de cécité. Parmi différentes stratégies thérapeutiques actuellement étudiées, notre équipe s'intéresse au potentiel régénératif de la rétine. Une source cellulaire d'intérêt sont les cellules de Müller, principal type de cellules gliales de la rétine, capables de se réactiver en cas de dégénérescence et d'adopter certaines caractéristiques de cellules souches. Elles entrent alors dans un état appelé gliose réactive. Tandis que chez certaines espèces comme le poisson, elles permettent la régénération de la rétine, elles ont des capacités régénératives très limitées et inefficaces chez les mammifères. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires régissant la gliose réactive des cellules de Müller est donc essentielle si l'on veut identifier des cibles thérapeutiques capables de stimuler le potentiel de régénération de ces cellules. Dans ce contexte, le but de mon projet de thèse a été d'étudier le rôle du co-facteur de transcription YAP dans la réactivation des cellules de Müller. Cette protéine est l'effecteur de la voie de signalisation Hippo, connue pour son implication dans la régulation des cellules souches et la régénération de certains organes.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse transcriptomique qui a montré que la voie Hippo/YAP est une des principales voies dérégulées dans un modèle de dégénérescence rétinienne chez la souris. Nous avons ensuite montré que la protéine YAP est spécifiquement exprimée dans les cellules de Müller et que son expression et son activité transcriptionnelle sont augmentées au cours de la dégénérescence lorsque les cellules de Müller deviennent réactives. Ces données suggèrent pour la première fois un lien entre YAP et la gliose réactive dans la rétine. Par conséquent, dans un second temps, mon projet de thèse a consisté en l'étude fonctionnelle de YAP dans les cellules de Müller. Dans ce but, nous avons généré par croisements chez la souris un modèle inducible de délétion du gène *Yap* spécifiquement dans ces cellules. Ce modèle a permis de montrer qu'en absence de *Yap* en conditions physiologiques, plusieurs gènes spécifiques des cellules de Müller sont dérégulés, suggérant un dysfonctionnement de ces cellules. L'étude phénotypique a permis de révéler que ces dérégulations moléculaires conduisent à un vieillissement prématuré des cellules de Müller et à une baisse de la vision chez les souris âgées. Ces données suggèrent que YAP est requis pour le fonctionnement normal des cellules gliales de Müller. Nous avons ensuite examiné l'impact de la perte de *Yap* dans les cellules de Müller en conditions de dégénérescence des photorécepteurs. Une analyse transcriptomique a permis de montrer que différents aspects de la réponse moléculaire des cellules de Müller réactives sont affectés. Parmi les processus biologiques dérégulés, nous nous sommes intéressés à la régulation de la prolifération cellulaire. Nous avons montré que YAP est nécessaire à l'augmentation de l'expression de gènes associés à la réentrée dans le cycle cellulaire de la glie de Müller. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que des composants de la voie de signalisation EGFR, connue pour son rôle central dans la réactivation des cellules de Müller, sont régulés par YAP.

Dans l'ensemble, ces résultats révèlent l'importance de YAP (*i*) dans le fonctionnement des cellules de Müller en conditions physiologiques pour maintenir l'homéostasie rétinienne, et (*ii*) dans la régulation des processus de réactivation de ces cellules en conditions dégénératives. De plus, ces données permettent de proposer un modèle selon lequel YAP serait impliqué dans le contrôle de la réentrée des cellules de Müller dans le cycle cellulaire *via* une interaction avec la voie de signalisation EGFR. Ce travail a donc contribué à approfondir nos connaissances du réseau de signalisation impliqué dans la réactivation des cellules de Müller de la rétine des mammifères.

Mots clés : Cellules gliales de Müller ; Régénération rétinienne ; Voie de signalisation Hippo/YAP ; Voie de signalisation EGFR ; Gliose réactive ; Prolifération cellulaire





## LISTE DES ABREVIATIONS

- AAV:** Adeno Associated Virus
- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- ARN:** Acide ribonucléique
- ATP:** Adénosine Triphosphate
- CCG:** Couche des cellules ganglionnaires
- CKO:** Conditional knockout
- CMZ:** Ciliary Marginal Zone
- CNE:** Couche Nucléaire Externe
- CNI:** Couche Nucléaire Interne
- DMLA:** Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
- DSS:** Dextran Sulphate de Sodium
- EPR:** Epithélium Pigmentaire Rétinien
- FN:** Couche des Fibres Nerveuses
- HEK:** Human Embryonic Kidney
- MNU:** N-methyl-N-nitrosourea
- NIRG:** nonastrocytic inner retinal glial cell
- NMDA:** N-Methyl-D-Aspartate
- 4-OHT:** 4-Hydroxytamoxifen
- RCS:** Royal College of Surgeons
- ROS:** Reactive Oxygen Species
- ZMC:** Zone Marginale Ciliaire



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b> .....	7
<b>I. LA RETINE</b> .....	7
1. Structure de la rétine.....	7
2. Maladies dégénératives de la rétine .....	11
<b>II. LES CELLULES GLIALES DE MÜLLER</b> .....	19
1. Les cellules gliales de Müller en conditions physiologiques .....	19
2. Les cellules gliales de Müller en conditions pathologiques .....	29
3. Conclusion .....	73
<b>III. LES CO-FACTEURS DE TRANSCRIPTION YAP ET TAZ</b> .....	75
1. La voie de signalisation Hippo .....	75
2. Structure de YAP et TAZ .....	77
3. Régulation de YAP/TAZ.....	81
4. Partenaires et gènes cibles de YAP/TAZ.....	85
5. Fonctions de YAP/TAZ .....	89
6. YAP/TAZ dans le système nerveux .....	115
<b>IV. OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE</b> .....	127
<b>RESULTATS</b> .....	131
<b>I. ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE YAP DANS LA RETINE EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE DE DEGENERESCENCE RETINIENNE</b> .....	131
1. Modèles utilisés.....	131
2. Principaux résultats .....	133
<b>II. ANALYSE FONCTIONNELLE DU RÔLE DE YAP DANS LES CELLULES DE MÜLLER</b> .....	161
1. Modèles utilisés.....	161
2. Principaux résultats .....	163
<b>III. POURSUITE DU PROJET</b> .....	231



1. Etude de l'impact de la perte de Yap sur la prolifération des cellules de Müller en condition de dégénérescence in vivo et ex vivo.....	231
2. Etude de l'impact de la suractivation de Yap sur la réponse des cellules de Müller en condition de dégénérescence .....	233
3. Etude de l'interaction entre YAP et la voie de signalisation EGFR .....	235
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	239
1. YAP est spécifiquement exprimé dans les cellules de Müller de la rétine adulte.....	239
2. YAP semble nécessaire au bon fonctionnement des cellules de Müller.....	241
3. YAP : un nouvel acteur de la réactivation des cellules de Müller .....	245
4. YAP au sein d'un réseau complexe de signalisation ? .....	249
5. YAP pour stimuler le potentiel régénératif des cellules de Müller ?.....	251
6. YAP acteur de la réponse inflammatoire de la rétine en condition de dégénérescence ? .....	255
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	259
<b>ANNEXES</b> .....	311

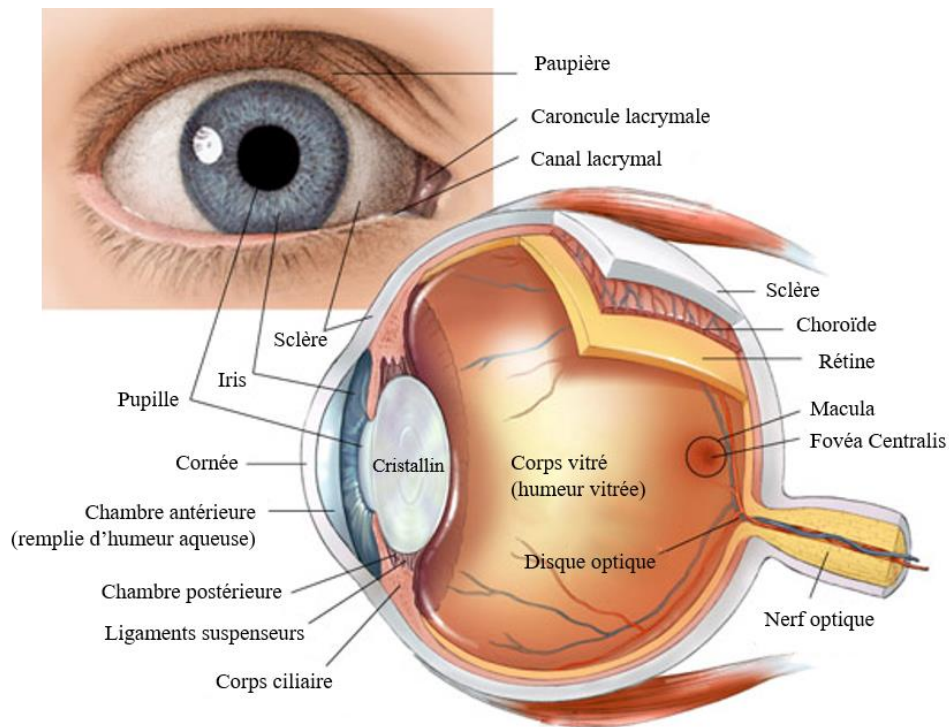


---

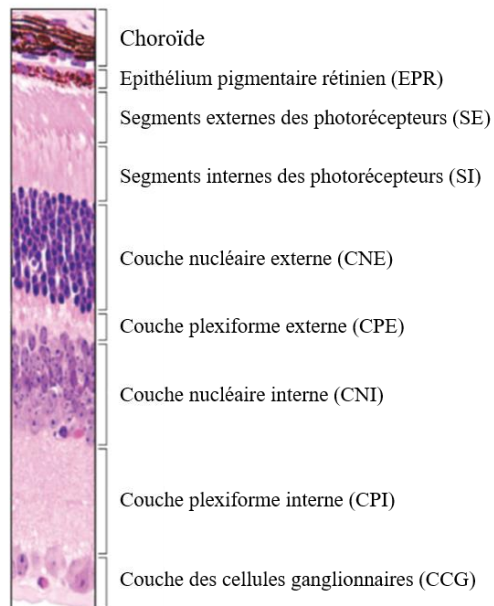
# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

---





**Figure 1: Coupe sagittale schématique de l'œil humain adulte.** Cette illustration montre les principaux tissus de l'œil humain. 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.



**Figure 2: Organisation stratifiée de la rétine.** Coloration histologique d'une coupe transversale dans la partie centrale d'une rétine de souris. D'après (Veleri et al 2015).

# INTRODUCTION

## I. LA RETINE

### 1. Structure de la rétine

L'œil est une sphère remplie de liquide et formée de trois couches de tissus ou tuniques : la tunique fibreuse, la tunique vasculaire et la tunique nerveuse ou rétine.

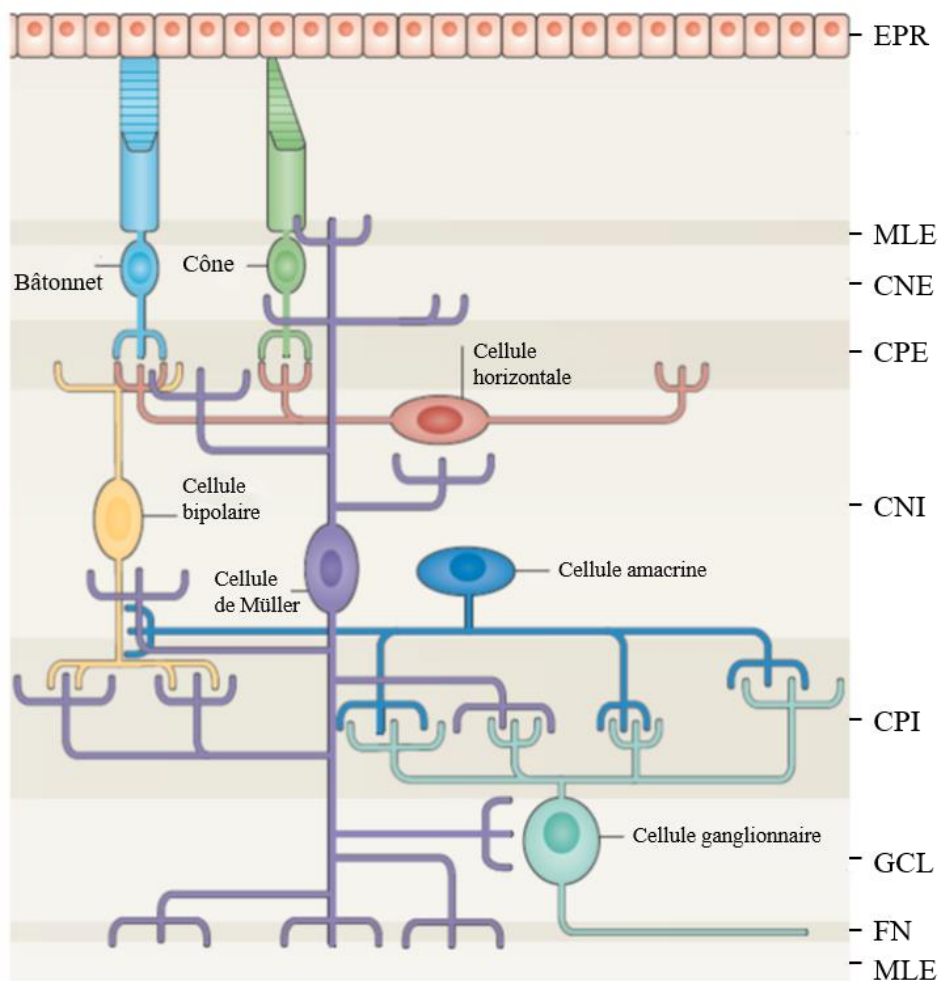
La **rétine** est la tunique la plus interne de l'œil ([Figure 1](#)) et la seule contenant une population de neurones capables de transmettre l'information visuelle au cerveau. Elle est constituée de l'épithélium pigmentaire, qui empêche la lumière de diffuser dans l'œil, et de la neurorétine responsable de la formation et du traitement de l'information lumineuse en information électrique.

L'**épithélium pigmentaire rétinien (EPR)** joue un rôle crucial dans le bon fonctionnement de la rétine ainsi que dans le maintien de son intégrité. Il est formé d'une monocouche de cellules épithéliales pigmentées. La membrane apicale de ces cellules est au contact des segments externes des photorécepteurs tandis que le côté basal fait face à la choroïde.

La **neurorétine** est un tissu d'origine neuroectodermique, dérivé du diencéphale, en ce sens, elle fait partie du système nerveux central. C'est un tissu stratifié et composé de six types de cellules neuronales (deux types de photorécepteurs : cônes et bâtonnets, cellules horizontales, bipolaires, amacrines et ganglionnaires) et d'un type de cellules gliales (cellules gliales de Müller) qui sont tous issus des mêmes progéniteurs neuronaux. Chacun de ces types cellulaires est localisé dans une couche rétinienne particulière. La neurorétine est ainsi organisée en couches de noyaux cellulaires alternant avec des couches de synapses et de prolongements de cellules gliales (Behar-Cohen et al. 2009).

L'observation d'une coupe transversale de la neurorétine permet de visualiser différentes couches bien délimitées ([Figure 2](#)) dont trois couches nucléaires :

- la **couche nucléaire externe (CNE)**, constituée des corps cellulaires des photorécepteurs
- la **couche nucléaire interne (CNI)** composée des corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et gliales de Müller
- la **couche des cellules ganglionnaires (CCG)**, constituée majoritairement de cellules ganglionnaires mais également de quelques cellules amacrines appelées « amacrine déplacées ».



**Figure 3: Anatomie de la rétine.** Illustration des principaux types de cellules rétinienne et leur organisation dans la rétine. Six types de neurones et un type de cellule gliale sont répartis dans les différentes couches : les corps cellulaires des photorécepteurs de type bâtonnet et cône sont dans la couche nucléaire externe (CNE), les corps cellulaires des interneurons (cellules bipolaires, horizontales et amacrines) sont dans la couche nucléaire interne (CNI) avec les noyaux des cellules de Müller ; les corps cellulaires des cellules ganglionnaires sont dans la couche des cellules ganglionnaires (CCG). Les prolongements des cellules ganglionnaires passent sous la CCG et forment la couche des fibres nerveuses (FN). Les synapses entre les photorécepteurs et les interneurons forment la couche plexiforme externe (CPE), et les synapses entre les interneurons et les cellules ganglionnaires forment la couche plexiforme interne (CPI). Les prolongements cytoplasmiques des cellules de Müller participent à la formation de la membrane limitante interne (MLI) et de la membrane limitante externe (MLE). L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est formé de cellules pigmentées qui absorbent la lumière et sont en contact avec les photorécepteurs. D'après (Goldman et al 2014).

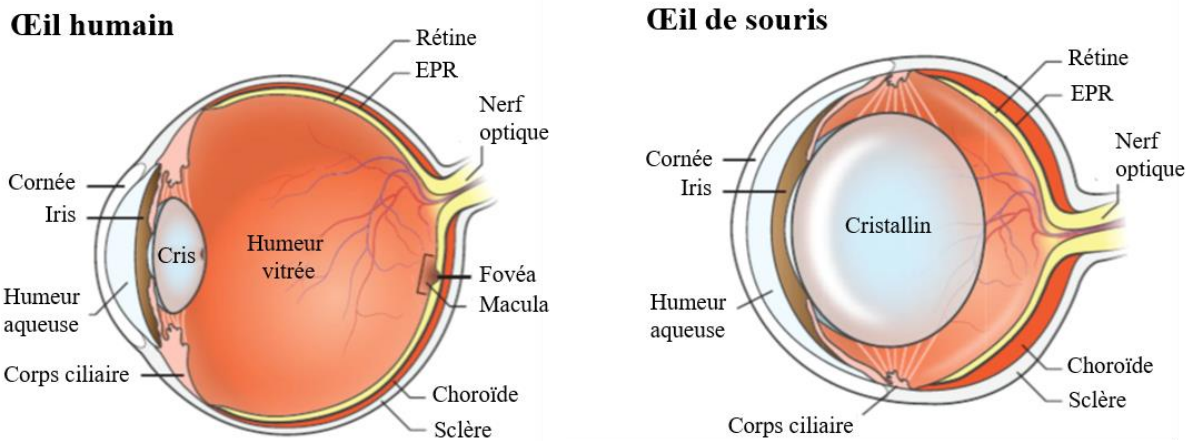
Les **photorécepteurs** sont des neurones sensoriels hautement spécialisés qui convertissent l'énergie lumineuse en signal électrique grâce au processus de phototransduction. La rétine des vertébrés contient deux types de photorécepteurs : les cônes responsables de la vision photopique, des couleurs et de l'acuité visuelle et les bâtonnets responsables de la vision scotopique (faible condition d'éclairage). Les **cellules bipolaires** sont responsables de la transmission du signal nerveux des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires. Les **cellules horizontales** et les **cellules amacrines** permettent, elles, de moduler le signal électrique envoyé aux cellules ganglionnaires. Les **cellules ganglionnaires** sont chargées de recevoir le message nerveux qui a traversé l'ensemble de la rétine et de le transmettre au cerveau via leurs axones qui se rejoignent pour former le nerf optique (Figure 3) (Behar-Cohen et al. 2009).

Bien que la rétine ne possède que sept 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 amacrines et ganglionnaires (Masland 2001; Masland 2012).

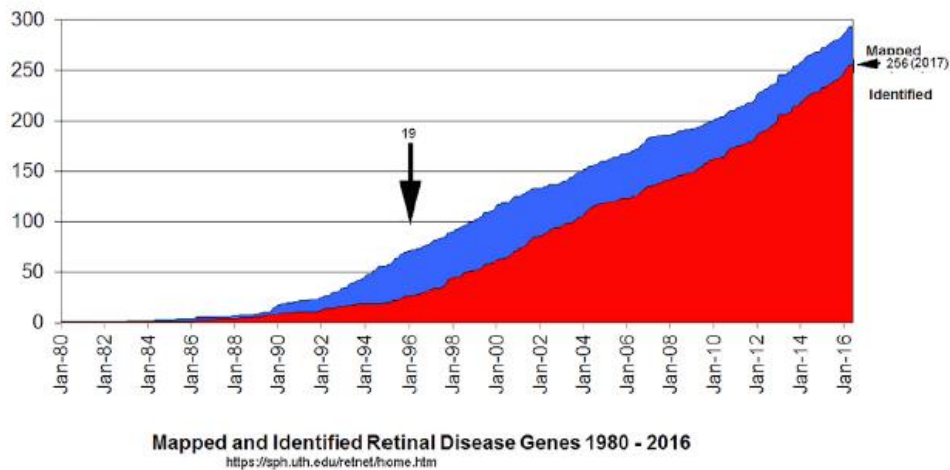
Il faut noter que les primates possèdent une **macula**, qui correspond à une zone plus sombre au centre de la rétine et qui est dépourvue de vaisseaux sanguins afin d'optimiser la vision centrale. Au centre de la macula se trouve la fovéa centralis, qui correspond à une petite dépression contenant quasi uniquement des cônes (Figure 4). Ainsi, la densité de cônes diminue en s'éloignant de la fovéa centralis tandis que celle des bâtonnets augmente avant de décroître à son tour en allant vers la périphérie de la rétine.

Chez certains vertébrés comme les mammifères, des **astrocytes** et des **cellules microgliales** résident également dans la rétine. Les astrocytes qui sont principalement dans la couche des fibres nerveuses (FN) et dans la couche des cellules ganglionnaires (CCG), ont des fonctions importantes pour l'homéostasie rétinienne et la fonction visuelle (De Hoz et al. 2016). Les cellules microgliales sont des cellules immunitaires qui peuvent être considérées comme de véritables macrophages spécialisés de la rétine (Li et al. 2015).

La majorité des rongeurs ne possèdent pas de macula. Chez ces animaux les cônes ne sont pas concentrés en un point de la rétine mais répartis de manière plus homogène.



**Figure 4: Structure de l'œil humain et de l'œil de souris.** Coupe sagittale schématisées de l'œil humain (en haut) et de l'œil de souris (en bas). La lumière est focalisée par les éléments optique (comme la cornée et le cristallin) sur la neurorétine à l'arrière de l'œil. La partie centrale de la neurorétine constituée uniquement de cônes chez l'humain est appelée fovéa et permet la haute résolution. La région autour de la fovéa est la macula. Elle contient une forte densité de cônes par rapport à la rétine périphérique. La rétine de souris n'a ni fovéa ni macula. De manière relative à la taille de l'œil, le cristallin est beaucoup plus large chez la souris que chez l'humain. D'après (Veleri et al 2015).



**Figure 5: Progression dans la découverte des gènes responsables des maladies dégénératives de la rétine.** En 1996, 19 gènes étaient connus (flèche verticale). En 2017, 256 gènes responsables de pathologies rétinienne sont identifiés (flèche horizontale). D'après (Bennett et al 2017).

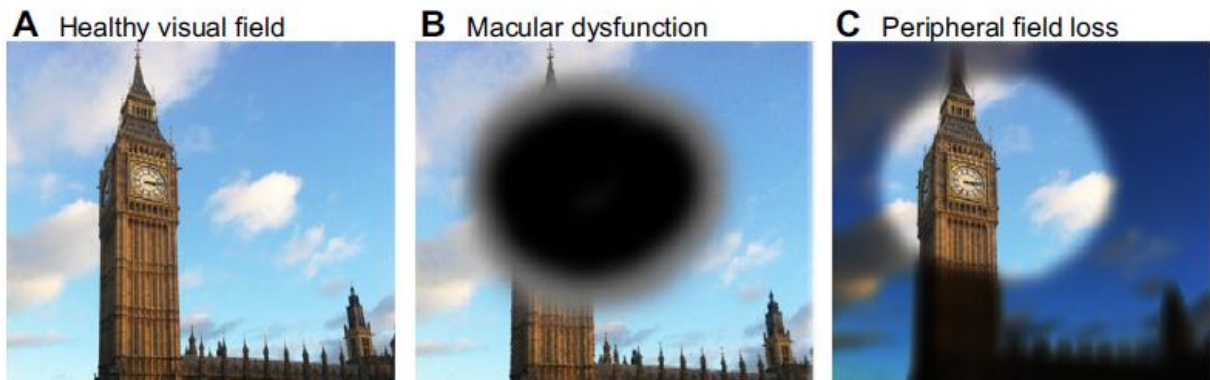
## 2. Maladies dégénératives de la rétine

### 2.1. Principales maladies dégénératives de la rétine

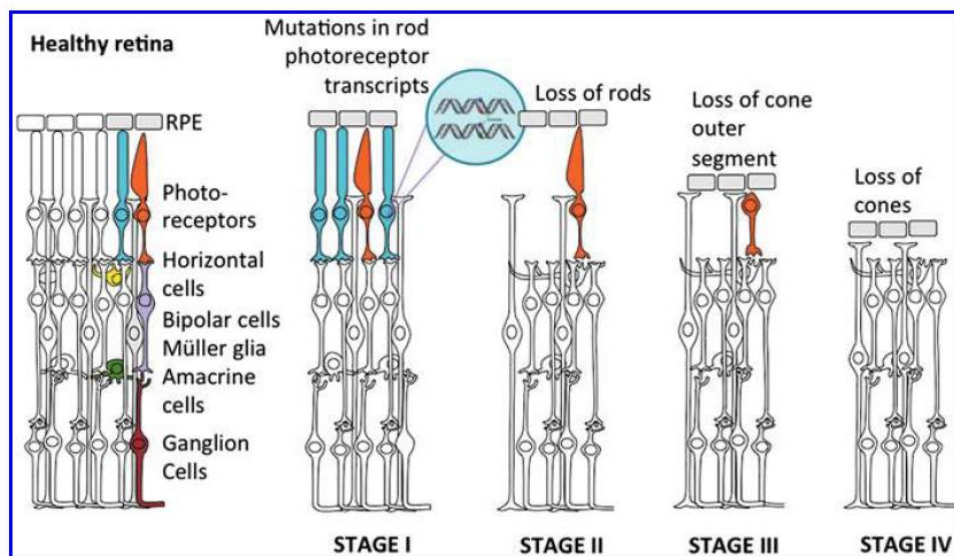
Les maladies dégénératives de la rétine ou dégénérescences rétinienne sont une des principales causes de cécité chez l'Homme. Il s'agit d'un ensemble de maladies d'origine et de forme clinique variées qui ont pour caractéristique commune une perte plus ou moins progressive de la vision due principalement à la dégénérescence des photorécepteurs. Les photorécepteurs peuvent être lésés directement ou dégénérer secondairement suite à une atteinte de l'épithélium pigmentaire par exemple (Veleri et al. 2015; Athanasiou et al. 2013).

Il existe de nombreuses causes de dégénérescence rétinienne mais de manière simplifiée, il est possible de classer ces maladies en deux sous-groupes : les maladies génétiques **monogéniques** dites maladies mendéliennes comme la rétinite pigmentaire et les maladies **multifactorielles** comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Veleri et al. 2015).

Les maladies mendéliennes comprennent, par exemple, la rétinite pigmentaire, l'amaurose congénitale de Leber ou encore la maladie de Stargardt. De très nombreux gènes ont été mis en cause au cours de la dernière décennie puisque actuellement plus de 250 gènes ont été identifiés (Figure 5) (Bennett 2017). Le mode de transmission de ces maladies ainsi que leur forme clinique sont très variables. Ainsi, différentes mutations d'un même gène peuvent entraîner des formes cliniques différentes alors que des mutations de gènes différents donnent parfois des formes cliniques similaires. La **rétinite pigmentaire** est l'une des maladies monogéniques les plus fréquentes avec une personne sur 3500 à 4000 atteinte. Elle regroupe plusieurs pathologies caractérisées par, dans un premier temps, la diminution de la vision dans des conditions de faible luminosité, puis, par la perte de la vision périphérique de jour conduisant à une vision « en tunnel » (Figure 6). Dans de nombreux cas, la dégénérescence fini par atteindre la rétine centrale et conduit donc à la cécité (Jayakody et al. 2015). Dans cette pathologie ce sont en fait d'abord les photorécepteurs de type bâtonnet qui meurent ce qui entraîne dans un second temps la dégénérescence des cônes (Figure 7). La variabilité des mutations géniques responsables des rétinites pigmentaires induit une grande variabilité dans l'apparition des premiers symptômes de dégénérescence. En effet, ceux-ci peuvent débuter à n'importe quel âge avec une fréquence d'apparition plus importante entre 10 et 30 ans.



**Figure 6: Impact de la dégénérescence rétinienne sur le champ visuel.** (A) Champ visuel normal. (B) Champ visuel en cas de dégénérescence de la macula comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). (C) Champ de vision en tunnel chez un individu atteint de rétinite pigmentaire. D'après (Ramsden et al 2013).



**Figure 7: Progression de la dégénérescence rétinienne : exemple d'une rétinite pigmentaire autosomique dominante.** La rétine saine est constituée de cinq types de neurones dont les photorécepteurs. Dans la rétinite pigmentaire, des mutations touchant principalement des transcrits spécifiques des bâtonnets (en bleu) conduisent leur à dégénérescence (Stade I). La dégénérescence progressive des cônes suit (Stade II et III). Au stade final de la maladie (Stade IV), tous les photorécepteurs sont morts conduisant à la cécité. D'après (Dalkara et al 2016).

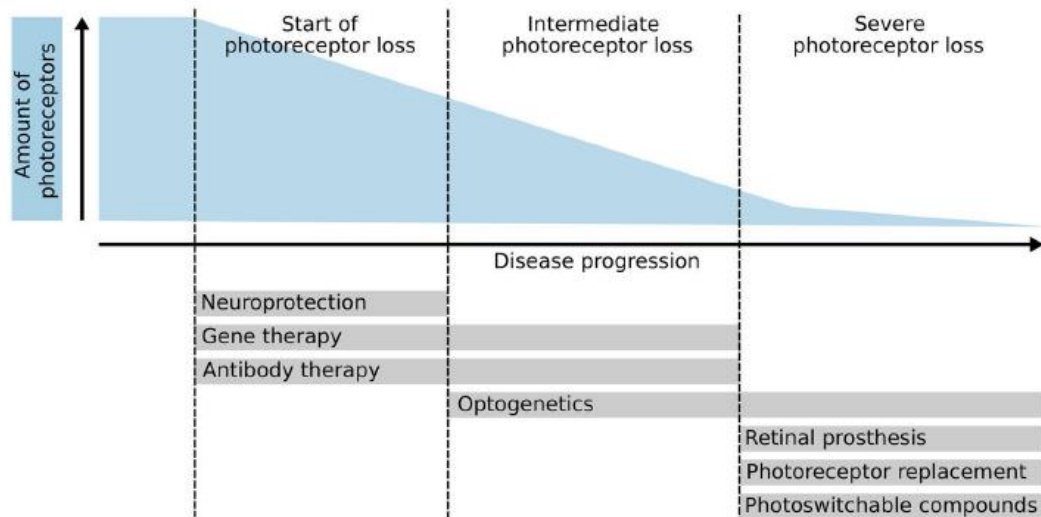
La **dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)** est la maladie dégénérative de la rétine la plus fréquente. La DMLA n'est pas uniquement liée à des facteurs génétiques mais également à des facteurs environnementaux. Elle est, comme son nom l'indique, liée au vieillissement mais d'autres facteurs interviennent comme le tabagisme ou encore l'exposition solaire excessive dès le plus jeune âge (Evans 2001). La maladie apparaît en général après l'âge de 50 ans. Dans cette pathologie, la baisse d'acuité visuelle est due à l'atteinte de la macula. À un stade avancé, une tache aveugle apparaît au centre du champ de vision mais la vision périphérique est conservée (Figure 6). Il existe deux formes de DMLA. La première est dite « sèche », ou atrophique. Cette forme, la plus fréquente, à une évolution lente et est la conséquence de la perte progressive des photorécepteurs de la macula. La seconde forme est dite « humide » ou exsudative et présente une progression rapide. Dans ce cas, la perte d'acuité visuelle est due à une néovascularisation anormale dans l'espace sous-rétinien.

## 2.2. Stratégies thérapeutiques

Contrairement à la rétine de certains vertébrés, comme les poissons et les amphibiens, la rétine des mammifères et donc des hommes n'est pas capable de régénérer spontanément. Et, malgré une connaissance de plus en plus accrue des mécanismes mis en jeu dans les pathologies dégénératives de la rétine, il n'existe pas de traitements curatifs pleinement efficaces à l'heure actuelle. Seule la forme « humide » de la DMLA est traitée par injection intra-vitréenne de molécules anti-VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) afin de réduire et/ou ralentir la néovascularisation. Ce traitement n'est cependant efficace que dans moins de la moitié des cas et la forme « sèche » de la DMLA qui représente les deux-tiers des patients n'est pas concernée par ce traitement (Finger et al. 2014). La recherche de nouveaux traitements est donc un enjeu majeur. Les principales stratégies thérapeutiques (Figure 8) explorées actuellement sont brièvement exposées ci-dessous.

La **neuroprotection** est un des axes de recherche majeur. Elle consiste en l'administration d'agents pro-survie, anti-apoptotiques et anti-inflammatoires. Ces stratégies ne traitent pas la cause de la dégénérescence mais tentent de stopper ou du moins de retarder la mort des photorécepteurs. Il a été montré que certains facteurs neurotrophiques comme le *Pigment Epithelium-Derived Factor* (PEDF), le *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) et le *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) sont capables de prolonger la survie des photorécepteurs mais l'impact sur la fonction visuelle est encore controversé. Malgré cet effet protecteur bénéfique pour le patient, la demi-vie de ces molécules étant courte, de tels traitements nécessitent des administrations répétées qui peuvent être un problème pour le passage en clinique. L'utilisation de vecteurs viraux pour exprimer les gènes codant ces facteurs neurotrophiques est en cours d'étude et pourrait permettre d'éviter les potentiels effets secondaires d'administrations répétées (Wen et al. 2012; Cuenca et al. 2014; Dalkara et al. 2016).





**Figure 8: Dégénérescence des photorécepteurs et stratégies thérapeutiques.** Aperçu des différentes approches thérapeutiques basées sur la progression de la maladie et de la quantité de photorécepteurs restants. Les stratégies thérapeutiques précoces comme la neuroprotection, la thérapie génique et le traitement aux anticorps nécessitent la présence de photorécepteurs endogènes pour être efficaces. A l'inverse, les prothèses rétiniennes, les thérapies de remplacement des photorécepteurs et les traitements par molécules photo-inductibles ont pour but de soigner des patients à des stades tardifs de la maladie quand il ne reste que peu ou pas de photorécepteurs. L'optogénétique a pour but de réactiver les photorécepteurs de type cônes qui restent mais ne fonctionnent pas. D'après (Santos-Ferreira et al 2017).

L'avantage majeur des stratégies neuroprotectrices réside dans le fait qu'elles sont potentiellement capables de cibler de nombreuses pathologies indépendamment par exemple de la mutation responsable de la maladie.

Une autre approche thérapeutique très prometteuse est la **thérapie génique**. Il s'agit cette fois de traiter la cause de la maladie voir de prévenir le développement de la maladie en inactivant et/ou remplaçant le gène muté. Cette stratégie nécessite le développement de vecteurs permettant d'exprimer les « gènes thérapeutiques » dans les cellules ciblées. L'utilisation de virus adéno-associés (AAV) ont permis de grands progrès dans ce sens et la thérapie génique fait, actuellement, l'objet de plusieurs essais cliniques. Par exemple, le premier essai clinique utilisant des AAV a débuté en 2007 et concerne le remplacement du gène codant la protéine RPE65 qui est muté dans 5 à 10 % des cas d'amaurose congénitale de Leber, une dystrophie rétinienne précoce (Bennett et al. 2012; Testa et al. 2013; Ashtari et al. 2015). Cette approche peut cependant être limitée par le fait qu'elle nécessite un diagnostic génétique précoce puisque les cellules ciblées doivent être encore vivantes au moment du traitement (Jayakody et al. 2015; Dalkara et al. 2016). Contrairement aux stratégies neuroprotectives, la thérapie génique est quasiment une médecine personnalisée au sens où dans la plupart des cas, elle ne pourra être administrée que pour un type de mutations géniques et donc un type de patients.

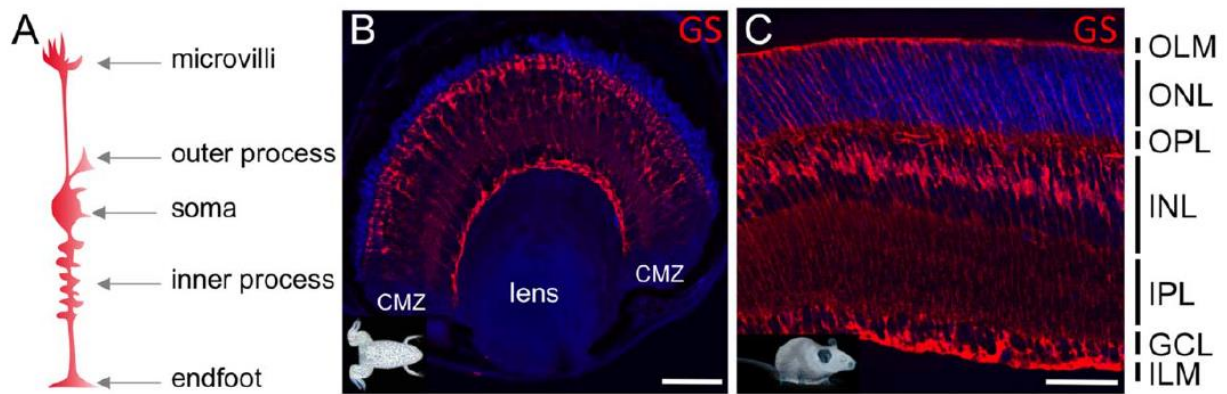
Dans le cas où les photorécepteurs sont déjà défectueux ou morts, d'autres stratégies doivent être explorées. L'**optogénétique** est une de ces stratégies alternatives. Ce procédé consiste à transformer des cellules de la rétine interne en cellules photosensibles en y exprimant un ou plusieurs gènes codant des protéines photo-activables telles que la channelrhodopsine, une protéine d'algue qui exposée à la lumière bleue laisse entrer les ions Na<sup>+</sup> dans les neurones, ce qui les dépolarise. Les résultats obtenus sur des modèles murins de dégénérescence rétinienne sont encourageants (Cuenca et al. 2014). Une autre alternative est l'**implant rétinien**. Il s'agit d'implants électroniques comprenant des électrodes qui viennent directement stimuler les neurones rétiniens. L'implant peut être épirétinien ou subrétinien. Plusieurs systèmes sont en cours d'évaluation en essais cliniques, et la recherche se poursuit pour améliorer leurs performances et la perception visuelle des patients (Mills et al. 2017).

La **thérapie cellulaire** est également l'une des principales stratégies thérapeutiques à l'étude. Elle est basée sur la transplantation de cellules afin de remplacer les cellules endommagées c'est-à-dire principalement les photorécepteurs et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Les chercheurs travaillent principalement sur la transplantation de cellules issues de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites (Ramsden et al. 2013; Dalkara et al. 2016; Garg et al. 2017; Santos-Ferreira et al. 2017; Jayakody et al. 2015).

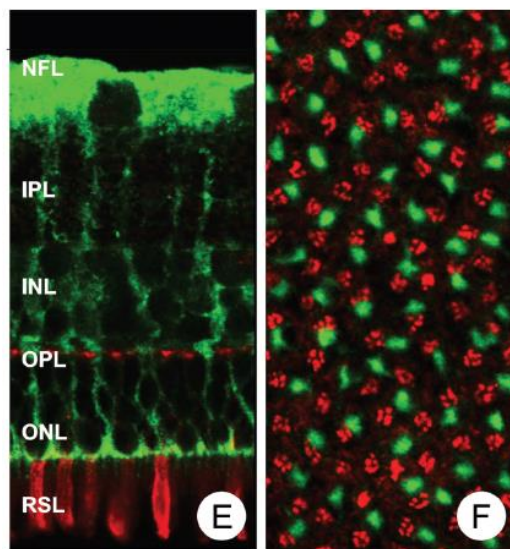


Différents laboratoires ont obtenu des résultats encourageant sur des modèles animaux de dégénérescence rétinienne (Pearson et al. 2012; Gonzalez-Cordero et al. 2013; Shirai et al. 2016). Les points critiques cette technique semblent être l'intégration des cellules transplantées dans la rétine hôte ainsi que la reconstruction de circuits neuronaux fonctionnels. A l'heure actuelle, différents essais cliniques sont en cours. La majorité des essais concernent la transplantation de cellules d'EPR chez des patients atteints de la forme sèche de la DMLA. Ces cellules d'EPR sont dérivées de cellules souches embryonnaires ou de cellules souches pluripotentes induites (IPSCs) (Dalkara et al. 2016; Garg et al. 2017; Santos-Ferreira et al. 2017; Jayakody et al. 2015).

Enfin, une alternative à la transplantation de cellules serait de s'appuyer sur le **potentiel neurogénique des cellules endogènes** de la rétine afin de régénérer les cellules perdues. En effet, bien qu'elle soit incapable de régénérer spontanément, la rétine humaine contient des cellules présentant des caractéristiques de cellules souches. Il existe essentiellement trois sources de cellules pourvues de potentiel neurogénique dans la rétine : les cellules de l'EPR, certaines cellules du corps ciliaire et les cellules gliales de Müller (Jayakody et al. 2015; Hamon et al. 2016). La recherche fondamentale s'applique depuis quelques années à essayer de mieux comprendre le fonctionnement de ces cellules afin de pouvoir un jour tirer parti de leur capacités régénératives dans un but thérapeutique. C'est dans cet optique que s'inscrit mon projet de recherche avec un intérêt tout particulier pour les cellules gliales de Müller.



**Figure 9: Les cellules gliales de Müller.** (A) Schéma de la morphologie des cellules gliales de Müller. (B,C) Marquage immunologique à l'aide d'un anticorps anti-glutamine synthétase (GS, rouge), un marqueur des cellules gliales de Müller, sur coupe transversale de rétine de xénope au stade 45 (B) et de souris à P30 (C). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Bien que les cellules de Müller des différentes espèces de vertébrés puissent varier dans leur morphologie, ces images illustrent des caractéristiques communes. Les cellules de Müller s'étendent radialement dans toute l'épaisseur de la rétine. Leur corps cellulaire réside dans la couche nucléaire interne (INL) et leurs prolongements cytoplasmiques apicaux (microvilli) et basaux (pieds) participent à la formation de la membrane limitante externe (OML et ILM) et interne respectivement. CMZ, zone marginale ciliaire ; ONL, couche nucléaire externe ; OPL, couche plexiforme externe, IPL, couche plexiforme interne, GCL, couche des cellules ganglionnaires. Barre d'échelle : 50  $\mu\text{m}$ . D'après (Hamon et al 2016).



**Figure 10: Chaque unité fonctionnelle de la rétine contient une cellule de Müller et un photorécepteur de type cône.** (E) Les segments internes des photorécepteurs de type cône apparaissent en continuité avec les prolongements cytoplasmiques externes des cellules de Müller qui entourent les noyaux des cônes dans la couche nucléaire externe (ONL). (F) Image centrée sur la couche plexiforme externe (OPL). Le nombre de pédicules de cône (rouge) est approximativement égal au nombre de prolongements de cellules de Müller (vert) et les deux éléments semblent être disposés en paires. Ainsi, chaque cône est lié à une cellule de Müller. NFL, couche des fibres nerveuses ; IPL, couche plexiforme interne ; INL, couche nucléaire interne ; RSL, couche des segments des photorécepteurs. D'après (Reichenbach & Bringmann 2013).

## II. LES CELLULES GLIALES DE MÜLLER

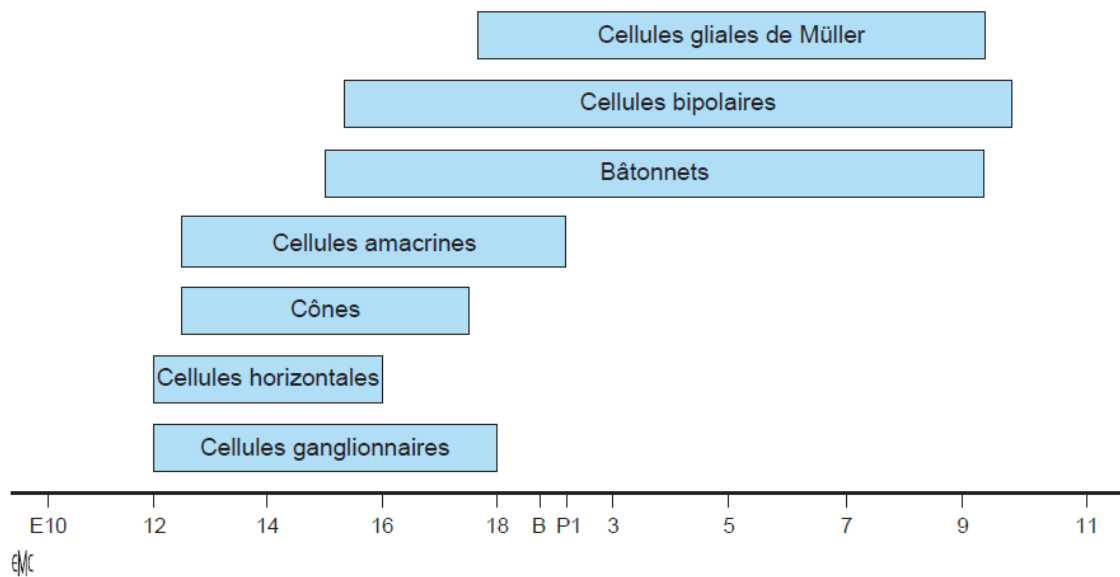
### 1. Les cellules gliales de Müller en conditions physiologiques

#### 1.1. Morphologie et origine des cellules de Müller

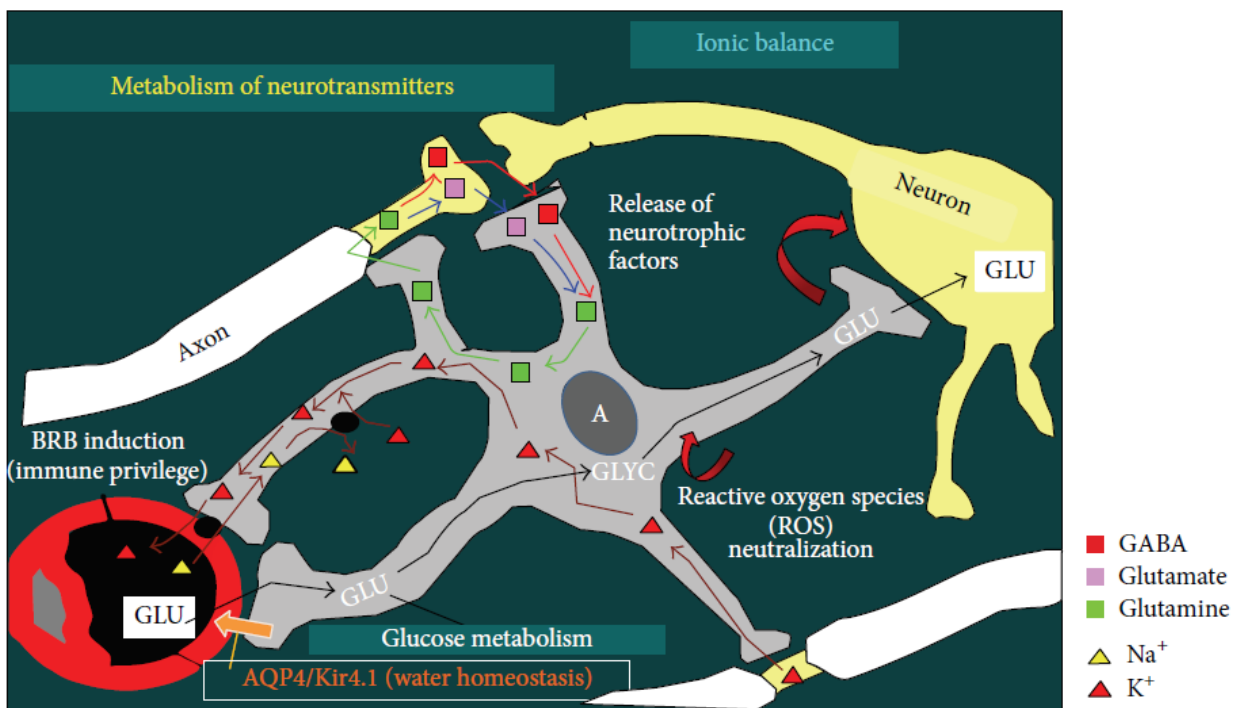
Les cellules gliales de Müller ont été décrites pour la première fois en 1851 par l'anatomiste Heinrich Müller (Müller 1851). Elles représentent entre 4 et 5 % des cellules rétiniennes mais sont le principal type de cellules gliales de la rétine (90%) (Strettoi & Masland 1995; Jeon et al. 1998). Ce sont des cellules macrogliales qui s'étendent radialement dans toute l'épaisseur de la rétine, des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires (Figure 9). Dans leur partie distale, elles forment avec les photorécepteurs mais également entre elles, de nombreuses jonctions adhérentes qui forment une structure nommée **membrane limitante externe**. Dans leur partie proximale, elles forment un pied, apposé sur la **membrane limitante interne** et en contact avec le vitré. Leur noyau se trouve dans la couche nucléaire interne, tandis que leurs prolongements entourent les autres cellules et les capillaires sanguins, participant ainsi à la **barrière hémato-rétinienne** (Behar-Cohen et al. 2009).

Les cellules de Müller sont donc en contact avec l'ensemble des cellules rétiniennes. Elles constituent ainsi un lien anatomique et fonctionnel entre les neurones rétiniens et les compartiments avec lesquels ils échangent des molécules, à savoir les vaisseaux sanguins, le vitré et l'espace sous-rétinien. Chaque cellule de Müller forme en fait le cœur d'une colonne de neurones rétiniens représentant la plus petite unité fonctionnelle de la rétine (Reichenbach et al. 1993). Chaque colonne formée autour d'une cellule de Müller contient un photorécepteur de type cône et, en fonction des espèces, un nombre variable de bâtonnets et de neurones de la rétine interne (Figure 10). Chez l'homme, une colonne contient 10 bâtonnets, 4 à 6 neurones de la couche nucléaire interne et 0,3 à 2,5 neurones de la couche des cellules ganglionnaires (Reichenbach & Bringmann 2010; Reichenbach & Bringmann 2013). Grâce à cette relation quasi symbiotique qu'elles entretiennent avec les neurones voisins, les cellules gliales de Müller exercent de nombreuses fonctions essentielles au maintien de l'homéostasie rétinienne et à la fonction visuelle. Ces différentes fonctions sont présentées dans la section 1.2.

Les cellules de Müller sont les seules cellules gliales de la rétine à partager une origine embryonnaire commune avec les neurones rétiniens (Turner & Cepko 1987; Holt et al. 1988; Wetts & Fraser 1988). Il faut noter cependant qu'une étude récente de lignage chez la souris suggère qu'une sous-population de cellules de Müller aurait pour origine la crête neurale (Liu et al. 2014). Ce résultat inattendu ouvre de nombreuses questions et nécessiterait de plus amples investigations, notamment une comparaison entre différentes espèces de vertébrés.



**Figure 11: Développement de la rétine.** Apparition des sept types cellulaires rétiniens chez la souris. Ceux-ci se différencient selon un ordre conservé entre les différentes espèces : d'abord les cellules ganglionnaires, suivies par les cellules horizontales, les cônes, les cellules amacrines, les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller. E: âge embryonnaire (en jours); B: naissance ; P: âge après la naissance (en jours). D'après (Behar-Cohen et al. 2009).



**Figure 12: Fonctions des cellules macrogliales de la rétine.** Schéma illustrant les fonctions des cellules macrogliales de la rétine (astrocytes et cellules de Müller). Les cellules macrogliales ont différentes fonctions essentielles pour la physiologie de la rétine et sont en relation étroite et permanente avec les neurones. Le schéma illustre les liens entre les cellules macrogliales, les neurones et la barrière hémato-rétinienne. D'après (de Hoz et al 2016).

Au cours du développement, les cellules de Müller sont les dernières cellules à se différencier et à devenir post-mitotiques. L'ordre de différenciation des différents types cellulaires de la rétine est en effet bien défini (Figure 11) (Cepko et al. 1996; Vecino & Acera 2015; Behar-Cohen et al. 2009). Les raisons pour lesquelles les progéniteurs rétiniens ne peuvent donner naissance à des cellules gliales de Müller qu'en fin de développement ne sont pas bien connues. Il semble que l'activité de facteurs de transcription tels que Notch1, Rax et Chx10 permettent à un sous-groupe de progéniteurs de rester non engagés dans une voie de différenciation jusqu'à ce que l'engagement dans la voie gliale soit possible.

Par ailleurs, différentes études transcriptionnelles ont montré que les cellules de Müller présentent un profil d'expression de gènes proche de celui des progéniteurs rétiniens en comparaison aux autres types cellulaires de la rétine c'est-à-dire les neurones (Livesey et al. 2004; Blackshaw et al. 2004; Roesch et al. 2008). Ainsi il semble que les cellules de Müller acquièrent des fonctions gliales tout en maintenant, en partie du moins, une signature moléculaire de progéniteurs tardifs (Jadhav et al. 2009). Cette particularité pourrait expliquer la capacité des cellules de Müller à acquérir un potentiel de cellules souches en cas de lésion de la rétine (voir section 2.3).

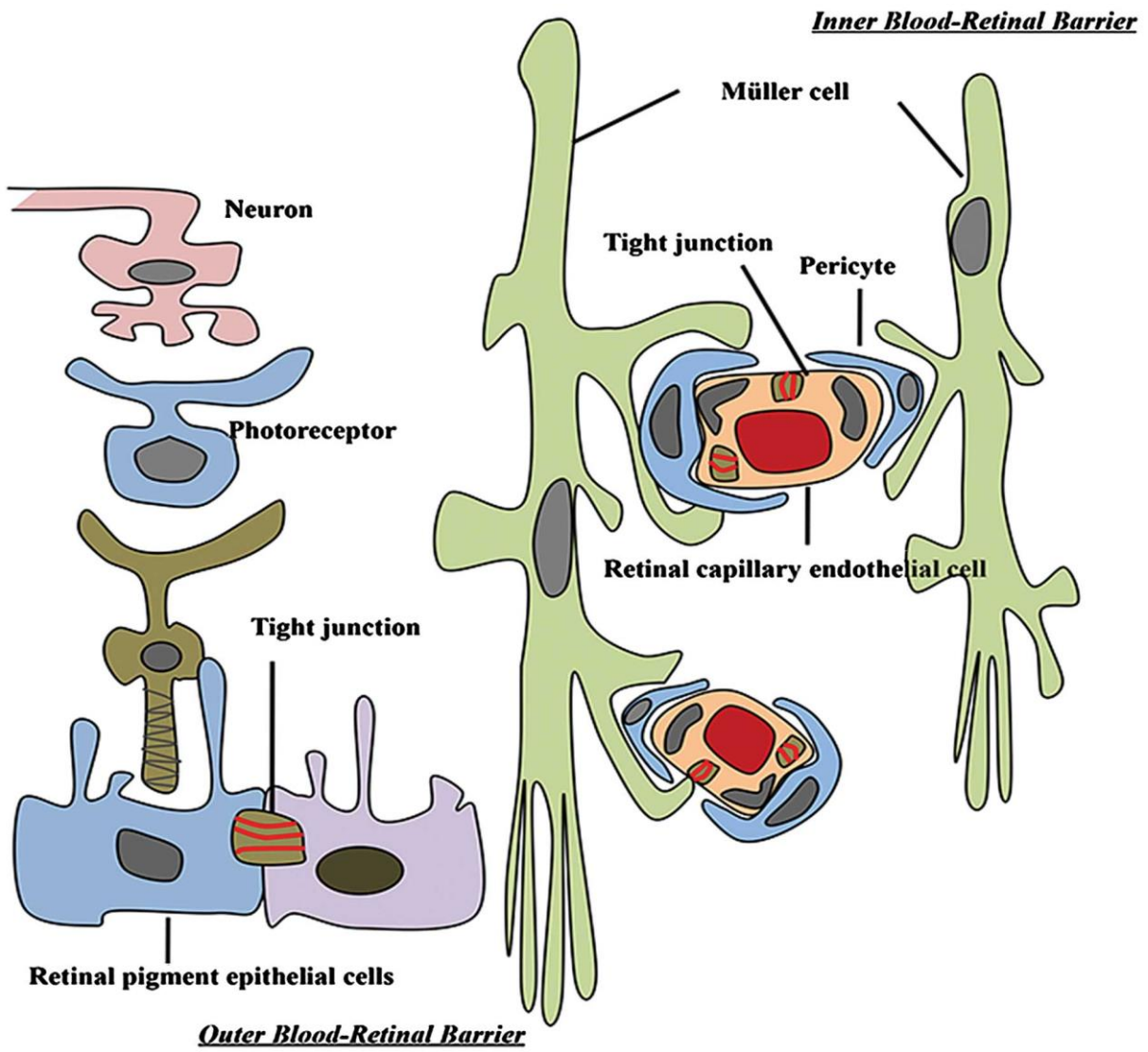
## 1.2. Fonctions des cellules de Müller

De par leurs relations très étroites avec l'ensemble des cellules de la rétine, les cellules gliales de Müller exercent de nombreuses fonctions cruciales pour le maintien de l'intégrité du tissu rétinien et le bon fonctionnement des neurones en conditions physiologiques (Figure 12). Les principales fonctions des cellules de Müller sont brièvement exposées dans cette section.

### 1.2.1 Support structural, homéostatique et trophique des neurones

Les cellules de Müller ont un rôle de **support structural** pour les neurones. Elles sont moins rigides que les neurones rétiniens et c'est leur élasticité qui permet de maintenir l'intégrité du tissu au cours de la croissance de la rétine ou encore en cas de dommages (Vecino et al. 2016). Les cellules de Müller agissent en fait comme des mécanosenseurs. Elles possèdent de nombreux canaux ioniques mécanosensibles dans les pieds au niveau de la membrane limitante interne et sont capables de réguler leur élasticité en diminuant ou augmentant l'expression de filaments intermédiaires comme la vimentine et la GFAP (Vecino et al. 2016; Lu et al. 2013). Les cellules de Müller sont également impliquées dans les propriétés mécaniques du tissu rétinien par leur fonction de sécrétion de protéines de la **matrice extra-cellulaire**. Elles produisent notamment de nombreuses glycoprotéines telles que les laminines ou les collagènes, des protéoglycanes ou encore des intégrines (Vecino et al. 2016).





**Figure 13: Barrière hémato-rétinienne.** Les cellules de Müller forment la barrière hémato-rétinienne interne en entourant les cellules endothéliales des capillaires rétiniens. D'après (Che et al 2014).

Une des fonctions majeures des cellules de Müller est le contrôle de l'**homéostasie osmotique et ionique** de la rétine par le transport d'eau et d'ions. Cette fonction est indispensable au bon fonctionnement de la rétine puisque les déséquilibres ioniques et osmotiques entraînent des dysfonctionnements des neurones. Les cellules de Müller régulent notamment la concentration extracellulaire en potassium en permettant des courants passifs de potassium grâce à des canaux ioniques spécifiques. Parmi ces canaux, le canal Kir4.1 est particulièrement important et enrichi au niveau des contacts avec les vaisseaux sanguins et au niveau des membranes limitantes. Ce canal permet aux cellules de Müller de capter le potassium en excès dans l'espace extracellulaire des neurones et de l'envoyer vers la circulation sanguine, le vitré ou l'espace sous-rétinien (Kofuji et al. 2000; Kofuji & Newman 2004; Nagelhus et al. 2004; Bringmann et al. 2006). Les cellules de Müller maintiennent également l'homéostasie osmotique grâce au transport rapide d'eau à travers les membranes gliales. Cette fonction fait intervenir des aquaporines comme AQP4 (Nagelhus et al. 2004; Bringmann et al. 2006; Vecino et al. 2016; Bringmann et al. 2004).

Une autre fonction des cellules de Müller est la **formation et la régulation de la barrière hémato-rétinienne** (Figure 13) (Reichenbach & Bringmann 2010; Reichenbach & Bringmann 2013; Che et al. 2014). Les prolongements des cellules de Müller engainent les vaisseaux sanguins formant ainsi la barrière hémato-rétinienne et permettant la communication et les échanges entre la circulation sanguine et les neurones. De plus, les cellules de Müller renforcent le fonctionnement des cellules endothéliales et donc de la barrière hémato-rétinienne en sécrétant des facteurs comme le Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF), la thrombospondine ou le Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF). A l'inverse, en sécrétant des facteurs tels que le VEGF ou le Tumor Necrosis Factor (TNF), elles peuvent augmenter la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne en cas de stress (hypoxie, carence en glucose) (Tout et al. 1993; Eichler et al. 2004; Newman & Reichenbach 1996; Reichenbach & Bringmann 2013). Elles sont donc des régulateurs clé de la barrière hémato-rétinienne. Il a d'ailleurs été montré, dans un modèle murin d'ablation conditionnelle des cellules de Müller, que leur absence entraîne des ruptures de la barrière hémato-rétinienne en cas d'ischémie (Shen et al. 2012). Les cellules de Müller sont impliquées dans le **métabolisme du glucose** de la rétine. Le glucose est le métabolite primaire utilisé par les cellules rétinienne pour générer de l'énergie en conditions aérobies aussi bien qu'anaérobies (Reichenbach & Bringmann 2010). Les cellules de Müller ont la particularité, par rapport aux neurones, de pouvoir adapter leur mode de métabolisme en fonction des ressources disponibles. Ainsi, elles peuvent privilégier un processus anaérobie, la glycolyse, pour produire de l'ATP à partir du glucose préservant ainsi l'oxygène pour les neurones. Pour ceci, elles peuvent utiliser les stocks de glycogène qu'elles renferment. De plus, le lactate produit par la glycolyse dans les cellules de Müller est transformé en pyruvate grâce à deux enzymes gliales et ensuite libéré dans le milieu



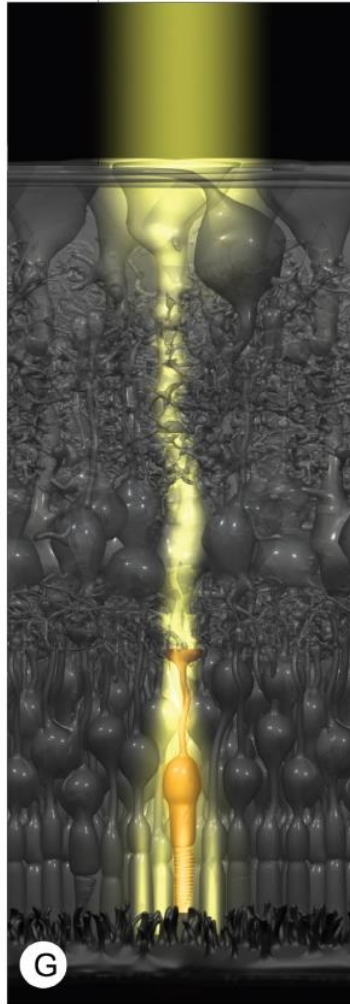
extracellulaire. Il est alors utilisé par les neurones comme substrat du cycle de Krebs pour générer leur propre énergie (Tsacopoulos & Magistretti 1996; Winkler et al. 2000; Bringmann et al. 2006; Vecino et al. 2016). Les cellules de Müller ont également des relations métaboliques avec les cellules microgliales puisqu'elles libèrent dans l'espace extra-cellulaire de l'ATP qui est utilisé par la microglie pour sa motilité (Wang & Wong 2010).

Les cellules gliales de Müller sont également nécessaires au **métabolisme lipidique** des neurones. En effet, les lipoprotéines de basse densité ou LDL (Low Density Lipoprotein en anglais) entrent dans la rétine via des récepteurs aux LDL situés dans les cellules de l'EPR et dans les cellules de Müller. Il existe ensuite un transfert de lipides des cellules gliales de Müller vers les neurones pour combler les besoins de ces derniers. Cet apport en lipides est tout particulièrement nécessaire pour le maintien des longs axones des cellules ganglionnaires, pour la formation des segments externes des photorécepteurs ou encore pour la formation de synapses (Mauch 2001; Tserentsoodol et al. 2006).

Les cellules de Müller produisent et libèrent des **agents antioxydants** pour protéger les neurones. L'activité normale de la rétine génère en effet de nombreux dérivés réactifs de l'oxygène ou ROS (reactive oxygen species) contre lesquels la rétine doit se défendre. Les cellules de Müller produisent du glutathion qui en cas de stress oxydatif est libéré vers les neurones où il sert de co-facteur à l'enzyme glutathion peroxydase pour réduire la quantité de ROS. Elles produisent également d'autres agents antioxydants comme de l'acide ascorbique, du pyruvate, de l' $\alpha$ -ketoglutarate ou encore des métallothionéines (García & Vecino 2003; Reichenbach & Bringmann 2013; Freitas & Reis 2017).

En plus des agents antioxydants, les cellules de Müller produisent de nombreux **facteurs neurotrophiques** et **facteurs de croissance** nécessaires à la survie des neurones. Cette fonction de neuroprotection, essentielle en cas de pathologie rétinienne, est présentée dans la section 2.4.

Les cellules de Müller ont des fonctions directement liées au fonctionnement des photorécepteurs de type cône. Elles **phagocytent les débris des disques des segments externes des cônes**. En effet, ces disques se renouvellent en permanence et ceci n'est possible que parce que les plus anciens sont éliminés (Long et al. 1986; Bejarano-Escobar et al. 2017). Elles sont également impliquées dans le **recyclage des pigments visuels des cônes**. Le recyclage des pigments visuels au cours du cycle visuel est effectué par voie enzymatique dans d'autres cellules que les photorécepteurs. Il a récemment été montré que les cellules de Müller possèdent les enzymes nécessaires et effectuent spécifiquement la régénération des pigments visuels des photorécepteurs de type cônes alors que les pigments des bâtonnets sont eux recyclés dans les cellules de l'EPR (J.-S. Wang et al. 2009; Wang & Kefalov 2011; Kaylor et al. 2013; Kaylor et al. 2014).



**Figure 14: Vue artistique de la conduction de la lumière à travers la rétine.** La lumière arrive à la surface interne de la rétine où elle frappe alors les pieds de de la cellule de Müller. La lumière se propage via les prolongements cytoplasmiques (contournant ainsi les structures rétiniennes diffusant la lumière, en particulier dans les deux couches plexiformes) jusqu'à arriver aux photorécepteurs. Chaque cellule de Müller illumine un groupe distinct de photorécepteurs, un cône et environ dix bâtonnets chez l'homme. D'après (Reichenbach et al 2013).

### 1.2.2 Régulation de l'activité neuronale

Bien qu'elles ne soient pas des neurones, les cellules gliales de Müller impactent directement l'activité synaptique de la rétine. Elles **modulent la quantité de neurotransmetteurs** présents au niveau des synapses grâce à de nombreux transporteurs spécifiques des neurotransmetteurs. Elles possèdent ainsi des systèmes de recapture et d'échange pour de nombreux neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'acid  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) ou la glycine. Le principal transporteur permettant la recapture du glutamate est appelé GLAST pour Glutamate Aspartate Transporter. Différentes études ont montré que GLAST est essentiel pour le maintien d'une activité synaptique normale. De plus, les cellules de Müller empêchent l'accumulation de glutamate dans l'espace extra-cellulaire qui peut être neurotoxique (Bringmann, Pannicke, et al. 2009; de Melo Reis et al. 2008).

Les cellules de Müller participent également à la **biosynthèse de neurotransmetteurs**. En effet, grâce à la présence de la glutamine synthétase, une enzyme présente uniquement dans les cellules de Müller, le glutamate capturé est transformé en glutamine. Cette glutamine est ensuite transportée dans les neurones où elle sert de précurseur pour la synthèse de glutamate et de GABA (Bringmann, Pannicke, et al. 2009; de Melo Reis et al. 2008).

En plus de participer à la recapture et à la biosynthèse des neurotransmetteurs utilisés par les neurones, les cellules de Müller produisent et libèrent des molécules appelées **gliotransmetteurs**. Il s'agit essentiellement de glutamate, d'ATP et d'adénosine. Ces gliotransmetteurs ont un effet excitateur (glutamate, ATP) ou inhibiteur (adénosine) sur les neurones voisins. Les cellules de Müller peuvent ainsi moduler directement l'activité neuronale. Les gliotransmetteurs agissent également de manière autocrine sur les cellules de Müller. Ils sont par exemple impliqués dans la régulation du volume cellulaire des cellules de Müller en fonction du volume cellulaire des neurones et de l'osmolarité du milieu extra-cellulaire qui varient au cours de la transmission synaptique. La régulation de volume des cellules de Müller est très importante pour éviter une hyperexcitabilité des neurones due à une diminution du volume extra-cellulaire (Reichenbach & Bringmann 2013; Newman 2015).

Enfin, une fonction récemment découverte des cellules gliales de Müller est la **conduction de la lumière**. Les cellules de Müller, telles des fibres optiques, servent de guide à la lumière qui doit traverser toute la rétine pour atteindre les photorécepteurs (Figure 14). Elles réduisent ainsi la diffusion intra-rétinienne de la lumière en conservant le diamètre du faisceau lumineux qui a atteint la rétine à l'interface vitré-rétine. Il semble que les pieds des cellules de Müller qui sont en forme d'entonnoir constituent des collecteurs de lumière à cet interface (Franze et al. 2007; Labin & Ribak 2010; Reichenbach & Bringmann 2013).



## 2. Les cellules gliales de Müller en conditions pathologiques

Comme vu précédemment, les cellules de Müller remplissent de nombreuses fonctions dans la rétine en bonne santé. En cas de lésion ou de pathologie, elles sont également des acteurs majeurs de la réponse rétinienne. Les cellules de Müller sont en effet plus résistantes que les neurones aux différentes atteintes de la rétine. Cette résistance est due au fait qu'elles ont un métabolisme spécial, des réserves d'énergie sous forme de glycogène, une grande quantité d'agents antioxydants ou encore qu'elles peuvent rapidement éliminer les excès de glutamate. Ainsi, elles survivent à la grande majorité des lésions ou maladies et peuvent donc exercer différentes fonctions liées au processus pathologique (Bringmann, Landiev, et al. 2009). Pour cela, elles s'activent et entrent dans un état appelé « gliose réactive ». Cette gliose réactive est associée à une réponse immunitaire et inflammatoire, à des fonctions de neuroprotection et chez certaines espèces à la prolifération des cellules de Müller pouvant mener à la régénération des neurones.

### 2.1. Gliose réactive

#### 2.1.1 Généralités

Le terme de gliose réactive englobe l'ensemble des modifications morphologiques, biochimiques et physiologiques des cellules de Müller en réponse à un stress ou un dommage rétinien. C'est une réaction très complexe qui fait intervenir de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires qui ne sont encore pas très bien connus. La gliose est déclenchée par des signaux provenant des cellules lésées ou malades qui vont activer des cascades de signalisation dans les cellules gliales de Müller provoquant leur changement d'état. De nombreuses études ont montré que les cellules de Müller s'activent rapidement et deviennent gliotiques en réponse à tous les types d'affections de la rétine (traumatismes physiques, ischémie, détachement de la rétine, maladies dégénératives, etc.) (Bringmann, Landiev, et al. 2009; Fernández-sánchez et al. 2015; Belecky-Adams et al. 2013).

Les cellules de Müller subissent alors des changements caractéristiques de la gliose réactive qui sont l'hypertrophie cellulaire, l'augmentation de l'expression des filaments intermédiaires (nestine, vimentine et GFAP), la réorganisation du tissu et de la vascularisation et la réentrée dans le cycle cellulaire. L'augmentation de la GFAP est souvent utilisée comme marqueur précoce de stress de la rétine et d'activation des cellules de Müller (Bringmann et al. 2006; Bringmann, Landiev, et al. 2009; Belecky-Adams et al. 2013).

La réponse des cellules de Müller à une lésion ou pathologie peut varier en fonction du type et de la sévérité de l'affection ainsi qu'en fonction du temps (Bringmann et al. 2006; Hippert et al. 2015).





De plus, chez un même individu, les cellules de Müller peuvent présenter une hétérogénéité et ne pas répondre de la même façon formant ainsi des sous-populations (Roesch et al. 2012; Vecino et al. 2016).

### **2.1.2 Effets bénéfiques et délétères**

La gliose réactive a un effet double sur la rétine. Dans un premier temps, quand elle est modérée ou « conservative », elle a des effets positifs sur la survie des neurones et l'intégrité du tissu mais dans un second temps, quand elle est massive, elle peut au contraire avoir des effets délétères et contribuer à la dégénérescence des neurones. Les cellules de Müller ont donc à la fois des effets neuroprotecteurs et neurotoxiques en cas de pathologie (Bringmann et al. 2006; Bringmann, Landiev, et al. 2009). Un bon exemple de cette dualité des cellules de Müller est la sécrétion de VEGF. Le VEGF, à faible concentration, a un effet protecteur des cellules endothéliales et des neurones. En revanche, son expression excessive et prolongée par les cellules de Müller cause des lésions vasculaires qui vont entraîner ou accélérer la mort des neurones (Tolentino et al. 2002; Coorey et al. 2012; Vecino et al. 2016; Le 2017). La rupture de la barrière hémato-rétinienne est une des lésions vasculaires ayant de lourdes conséquences négatives sur la survie des neurones et l'intégrité du tissu. En plus de cette rupture de la barrière hémato-rétinienne, la gliose massive peut également entraîner le gonflement osmotique des neurones et des cellules gliales qui contribue à la formation d'œdème et donc à la dégénérescence des neurones (Bringmann et al. 2006; Bringmann, Landiev, et al. 2009).

Les filaments intermédiaires impliqués dans la gliose réactive ont également des effets positifs et négatifs sur la rétine. Des études ont montré que l'expression des filaments intermédiaires GFAP, vimentine et nestine est nécessaire à la réactivation et au fonctionnement normal des cellules de Müller au cours de la dégénérescence (Lundkvist et al. 2004; Verardo et al. 2008). Cependant, à l'inverse, il a été montré que la perte de la GFAP et de la vimentine réduit la formation de cicatrices gliales et augmente la survie des photorécepteurs dans un modèle de détachement de la rétine (Nakazawa et al. 2007).

Ainsi, la balance « bénéfiques/risques » de la gliose réactive est un point critique pour les fonctions de neuroprotection et de régénération des cellules de Müller. Elle fait intervenir des régulations complexes et de nombreuses interactions entre les différents types cellulaires de la rétine. Mieux comprendre ces régulations et interactions est essentiel pour, dans une optique thérapeutique, stimuler les effets bénéfiques de la réactivation des cellules de Müller tout en évitant les effets secondaires détritimentaires.



## 2.2. Réponse immunitaire et inflammatoire

Les cellules de Müller jouent un rôle important dans les réponses immunitaire et inflammatoire de la rétine. Elles agissent comme des cellules immunocompétentes. Il a été montré que, en réponse à des signaux inflammatoires comme l'interféron- $\gamma$  sécrété par les lymphocytes T activés, elles deviennent cellules présentatrices d'antigène. Elles expriment alors des molécules de classe I et II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). De plus, elles produisent de nombreuses cytokines qui vont contribuer à l'initiation et/ou à la propagation de la réponse immunitaire. Les cellules de Müller régulent également la réponse immunitaire et l'adapte à la situation en inhibant la prolifération des lymphocytes T (Roberge et al. 1991; Bringmann, Landiev, et al. 2009; Kumar et al. 2013). Les cellules de Müller activées produisent la molécule d'adhésion intercellulaire ICAM-1 qui régule la migration des cellules infiltrées comme les macrophages et les lymphocytes T (Richardson et al. 1996).

Les cellules de Müller sont également actrices de la réponse inflammatoire. En cas de pathologie, elles répondent aux facteurs inflammatoires libérés par les cellules immunitaires circulantes infiltrées dans la rétine (macrophages, lymphocytes T) et par les cellules microgliales. Elles sécrètent alors de nombreux facteurs pro-inflammatoires (Bringmann, Landiev, et al. 2009; M. Wang et al. 2011; Eastlake et al. 2016). Une part importante de la fonction des cellules de Müller dans la réponse inflammatoire est ainsi la sécrétion de cytokines. En réponse à une lésion, les cellules de Müller activées sécrètent les cytokines pro-inflammatoires Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et Tumor necrosis Factor (TNF $\alpha$ ) (Nakazawa et al. 2006; Bringmann, Landiev, et al. 2009; Vecino et al. 2016). Ces cytokines peuvent agir de manière autocrine sur les cellules de Müller. Ainsi, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$  stimule la sécrétion d'IL-8 et de MCP-8 par les cellules de Müller (Yoshida et al. 2004). Ces molécules sont des chimiokines pro-inflammatoires qui promeuvent l'infiltration des cellules inflammatoires telles que les neutrophiles au site d'inflammation. Il a également été montré que IL-1 $\beta$  induit la sécrétion d'Interleukine-6 (IL-6) par les cellules de Müller via l'activation des voies de signalisation MAPK et NF- $\kappa$ B (Yoshida et al. 2001; X. Liu et al. 2015). Il a été montré que IL-6 protège les cellules ganglionnaires et les photorécepteurs de la mort (Inomata et al. 2003; Chong et al. 2008). Cependant, une expression dérégulée ou persistante d'IL-6 peut entraîner le développement de maladies auto-immunes ou de maladies inflammatoires chroniques (Mesquida et al. 2014). Une étude récente a mis en évidence que l'IL-1 $\beta$  stimule également la sécrétion de différentes chimiokines pro-inflammatoires telles que CCL2, CXCL1 et CXCL10 par les cellules de Müller (Natoli et al. 2017). Les différentes chimiokines sécrétées par les cellules de Müller sont impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules microgliales. Il y a donc une activation mutuelle des deux types de cellules gliales (Wang & Wong 2010; Rutar et al. 2015; Li et al. 2015; Natoli et al. 2017).



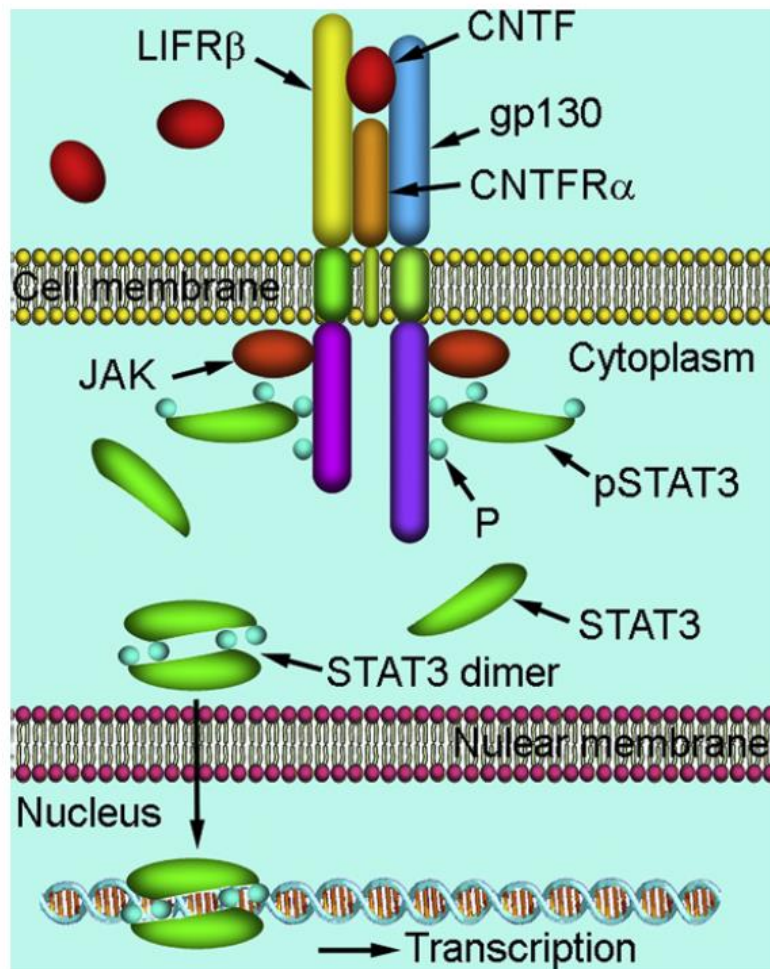
## 2.3. Neuroprotection

La neuroprotection est une fonction primordiale associée à la réactivation des cellules de Müller en condition pathologique. Les cellules de Müller sont en effet capables de protéger les photorécepteurs et les autres neurones de la rétine de la mort cellulaire grâce à la sécrétion de facteurs neurotrophiques, facteurs de croissance et cytokines. Des études ont en effet montré que les cellules de Müller, dans différentes conditions *in vitro* et *in vivo*, sécrètent de nombreux facteurs neuroprotecteurs. Les principaux facteurs qui sont étudiés sont le GDNF, CNTF, PEDF, bFGF et le BDNF (Bringmann, Landiev, et al. 2009). Ces facteurs peuvent agir directement sur les neurones rétinien exprimant les récepteurs correspondants. Cependant, il a été montré qu'au moins une partie de la neuroprotection exercée par ces facteurs est indirecte et passe par les cellules de Müller. Certains de ces facteurs neurotrophiques sécrétés par les cellules de Müller agissent donc de manière autocrine sur ces mêmes cellules pour y induire la sécrétion d'autres facteurs qui vont eux agir directement sur les neurones.

De nombreuses études visant à trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques pour améliorer la survie des photorécepteurs en cas de dégénérescence utilisent l'ajout de facteurs neurotrophiques exogènes comme le CNTF. Les cellules de Müller étant des acteurs clés de l'effet de ces facteurs exogènes, il est donc important de mieux connaître comment ces différents facteurs sont régulés, comment ils agissent via les cellules de Müller et comment ils interagissent entre eux. J'ai décidé de faire une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur les principaux facteurs neuroprotecteurs étudiés.

### 2.3.1 GDNF

Le GDNF ou Glial Derived Neurotrophic Factor est un des principaux facteurs impliqués dans la fonction neuroprotectrice des cellules de Müller. Dans la rétine de rongeur le GDNF est sécrété par les cellules de Müller et les astrocytes (Harada et al. 2003; Igarashi et al. 2000). Il a été montré que le GDNF améliore la survie et le fonctionnement des photorécepteurs chez la souris *rd1*, un modèle génétique de rétinite pigmentaire (Frasson et al. 1999). Les effets neuroprotecteurs du GDNF sur les photorécepteurs sont indirects et passent par l'activation des cellules de Müller (Harada et al. 2003; Hauck et al. 2006). Il a été montré *in vitro* que, en réponse à un apport de GDNF exogène, les cellules de Müller sont capables de sécréter différents facteurs neurotrophiques tels que BDNF, bFGF ainsi que GDNF lui-même (Harada et al. 2003). Les mécanismes d'action du GDNF ne sont pas bien connus mais il a été montré qu'il active la voie de signalisation MAPK/ERK dans les cellules de Müller (Hauck et al. 2006). Il a également été mis en évidence que le GDNF protège les neurones de la rétine (photorécepteurs et cellules ganglionnaires) en améliorant les fonctions de recapture du glutamate



**Figure 15: Signalisation du CNTF via STAT3.** Le CNTF se fixe au complexe CNTFR $\alpha$ , gp130 et LIFR $\beta$  et active la kinase JAK. La protéine JAK activée phosphoryle les résidus tyrosine (P) du domaine intracellulaire de la lachapine gp130 transductrice du signal, ce qui crée des sites de fixation pour le facteur de transcription STAT3. STAT3 est ensuite phosphorylé par la kinase JAK et P-STAT3 forme des dimères et transloque au noyau pour induire la transcription de gènes. D'après (Wen et al 2012).

des cellules de Müller en stimulant l'expression du transporteur de glutamate GLAST (Delyfer et al. 2005; Koeberle & Bähr 2008). Par ailleurs, une étude transcriptomique de la réponse des cellules de Müller au GDNF a montré que l'ostéopontine, une protéine de la matrice extra-cellulaire, pourrait être un des effecteurs du GDNF pour induire l'activité neuroprotectrice des cellules de Müller (Del Rio et al. 2011). Cette même étude a mis en évidence que l'ostéopontine est sécrétée par les cellules de Müller et supporte la survie des photorécepteurs dans des explants rétiniens de souris rd1. Les auteurs suggèrent que l'ostéopontine pourrait avoir un effet direct sur les photorécepteurs. Enfin, il a été montré que l'ostéopontine a un effet neuroprotecteur dose dépendant sur des photorécepteurs de porc en culture et agit en activant la voie de signalisation PI3K/AKT dans ces cellules (Del Rio et al. 2011). Une autre étude a montré que l'ostéopontine agit également de manière autocrine sur les cellules de Müller. Elle induit la sécrétion de VEGF, du glutamate, d'ATP et d'adénosine par ces cellules gliales. Enfin, ses effets neuroprotecteurs semblent passer également par l'inhibition du gonflement des cellules de Müller lié à la gliose et pouvant être cytotoxique (Wahl et al. 2013). Une autre protéine de la matrice extra-cellulaire, Cyr61, est également sécrétée par les cellules de Müller en réponse au GDNF et semble être un effecteur de ce dernier. Il a été montré que Cyr61 réduit la mort des photorécepteurs dans un modèle d'explants rétiniens de souris rd1. L'effet neuroprotecteur de Cyr61 sur les photorécepteurs semble être indirect et passer par l'activation des voies de signalisation MAPK/ERK et STAT3 dans les cellules de Müller (Kucharska et al. 2014).

### 2.3.2 CNTF

Le CNTF ou Ciliary Neurotrophic Factor est une cytokine de la famille de l'Interleukine-6 qui est capable d'améliorer la survie des photorécepteurs en cas de lésion (Lavail et al. 1992). Dans la rétine, le CNTF est localisé dans l'EPR, dans les astrocytes et dans les cellules de Müller (Walsh et al. 2001). Le niveau de CNTF dans la rétine est augmenté dans différents modèles de dégénérescence (Honjo et al. 2000; Nakamichi et al. 2003; Sarup et al. 2004) et il a été montré que cette augmentation est spécifique des cellules de Müller (Joly et al. 2007; Wen et al. 2012). Il semble qu'en plus de le sécréter, les cellules gliales de Müller soient les cellules sensibles au CNTF. Les cellules de Müller expriment le récepteur de basse affinité spécifique du CNTF, CNTFR- $\alpha$ , et il a été montré que l'injection *in vivo* de CNTF ou d'un analogue entraîne l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (Figure 15) principalement dans le noyau des cellules de Müller mais pas dans les photorécepteurs (Peterson et al. 2000). L'action neuroprotectrice du CNTF sur les photorécepteurs se fait donc de manière indirecte via les cellules de Müller (Zack 2000; Peterson et al. 2000). Une étude transcriptomique a montré que le CNTF entraîne des changements importants et rapides d'expression de gènes dans les cellules de Müller (Xue et al. 2011). Il a été montré que le CNTF fait évoluer les cellules gliales de Müller vers un phénotype plus neuroprotecteur caractérisé, par exemple, par une régulation plus efficace des niveaux de glutamate





extracellulaires (van Adel et al. 2005; Escartin 2006) et une résistance accrue au stress métaboliques (Escartin et al. 2007). L'activation des cellules de Müller par le CNTF a aussi comme conséquence essentielle la production d'autres cytokines de la famille de l'interleukine-6 comme le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) qui agissent sur les photorécepteurs via leur chaîne réceptrices communes transductrice du signal, la chaîne gp130, pour promouvoir leur survie (Rhee et al. 2013). Il a de plus été montré que le CNTF ne fait pas que réduire la mort des photorécepteurs mais permet aussi de préserver leur fonctionnalité (Heiduschka et al. 2013). Enfin, il faut noter que plusieurs études chez différentes espèces de mammifères dont la souris, le rat et l'homme ont montré que les photorécepteurs expriment les récepteurs CNTFR- $\alpha$  et pourraient donc être directement sensibles au CNTF (Beltran et al. 2005; Wen et al. 2012).

### **2.3.3 PEDF**

Les cellules de Müller activées sécrètent également du PEDF, ou Pigment Epithelium Derived Factor. La production de cette glycoprotéine par les cellules de Müller est augmentée en cas de lésion ou d'hypoxie. Le PEDF a des fonctions anti-oxydantes, anti-inflammatoires et également neuroprotectrices et neurotrophiques. Une étude réalisée dans un système de co-culture a montré que le PEDF sécrété par les cellules de Müller agit directement sur les récepteurs au PEDF à la surface des cellules ganglionnaires. Les auteurs proposent que le PEDF sécrété par les cellules de Müller agirait sur les cellules ganglionnaires alors que le PEDF sécrété par les cellules de l'EPR agirait sur les photorécepteurs (Unterlauff et al. 2012). *In vivo*, il a été montré que l'expression forcée de PEDF réduit la mort des cellules ganglionnaires chez la souris DBA/2J, un modèle génétique de glaucome (X. Zhou et al. 2009). Des études ont mis en évidence que, en réponse à un stress métabolique (stress oxydatif ou hypoxie), PEDF stimule l'expression de la glutamine synthétase et de GLAST améliorant les fonctions homéostatiques des cellules de Müller et donc la survie des neurones rétiniens et des cellules de Müller elles-mêmes (Xie et al. 2012; Y. Wang et al. 2015). L'action de PEDF sur les fonctions des cellules de Müller en cas d'hypoxie semble être anti-inflammatoire et passer par l'inhibition de l'IL-1 $\beta$  (Y. Wang et al. 2015). Par ailleurs, il a été montré que le PEDF sécrété par les cellules de Müller entraîne l'activation des voies de signalisation du facteur nucléaire kappa B ou NF- $\kappa$ B et MAPK/ERK dans les cellules ganglionnaires en souffrance (Unterlauff et al. 2012; Unterlauff et al. 2014). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B permet aux cellules ganglionnaires de se protéger d'une apoptose induite par l'hypoxie ou la déprivation de facteurs de croissance et augmente leur survie (Unterlauff et al. 2014).

### **2.3.4 bFGF**

Le bFGF ou basic Fibroblast Growth Factor est un facteur de survie important de la rétine en réponse à une lésion. Ce facteur de croissance est retrouvé dans l'EPR, dans les cellules ganglionnaires, dans



les astrocytes et dans les cellules de Müller (Walsh et al. 2001). Après une lésion induite par la lumière, le bFGF est également retrouvé dans le cytoplasme des photorécepteurs (Walsh et al. 2001). Des études ont montré que suite à un dommage de la rétine, le niveau de bFGF est rapidement augmenté dans la rétine et les cellules de Müller sont la principale source du bFGF sécrété (Bringmann, Landiev, et al. 2009). La sécrétion de bFGF par les cellules de Müller est stimulée par différents facteurs de croissance pro-angiogéniques et cytokines. Il a récemment été montré que l'effet neuroprotecteur du bFGF pourrait impliquer l'inhibition du gonflement osmotique des cellules de Müller et en moindre mesure celui des cellules bipolaires (Berk et al. 2015). Le bFGF a donc des effets neuroprotecteurs dans la rétine mais, comme le VEGF, il s'agit aussi d'un facteur pro-angiogénique qui peut aussi avoir des effets détritimentaires comme une néovascularisation aberrante (Bringmann, Landiev, et al. 2009; Yafai et al. 2013). Le bFGF et le VEGF agissent d'ailleurs de manière synergique sur les cellules endothéliales des micro-vaisseaux de la rétine (Yan et al. 2001). Il a aussi été montré *in vitro* que le bFGF stimule la production et libération de VEGF par les cellules de Müller (Hollborn et al. 2004).

### **2.3.5 BDNF**

Le BDNF, ou Brain Derived Neurotrophic Factor, est une neurotrophine sécrétée par les cellules de Müller en cas de dégénérescence. Des études ont montré que le BDNF est capable d'améliorer la survie des photorécepteurs, des cellules ganglionnaires ou autres neurones rétiniens en fonction des modèles de dégénérescence (Wexler et al. 1998; Mansour-Robaey et al. 1994; Schuettauf et al. 2004). Comme d'autres facteurs neurotrophiques, le BDNF agit sur les neurones indirectement par les cellules de Müller. Il ne peut en effet pas exercer directement son effet sur les photorécepteurs car la quasi-totalité de ces derniers n'expriment pas les récepteurs aux neurotrophines. Ces récepteurs sont le Trk (tropomyosin receptor kinase) qui a une forte affinité et le p75 qui a une faible affinité (Bringmann, Landiev, et al. 2009; de Melo Reis et al. 2008). Les mécanismes d'action du BDNF ne sont pas bien connus. Il a cependant été montré que le BDNF sécrété par les cellules de Müller induit la production de CNTF et bFGF par ces mêmes cellules (Wexler et al. 1998). De plus, il a été mis en évidence qu'une des fonctions de BDNF est de limiter le gonflement osmotique des cellules de Müller en augmentant l'expression du récepteur de neurotrophines TrkB et du récepteur au FGF dans ces cellules gliales (Berk et al. 2015). Une étude récente a d'ailleurs démontré que l'expression du récepteur TrkB dans les cellules de Müller est essentiel pour la neuroprotection des cellules ganglionnaires dans un modèle de lésion du nerf optique (Harada et al. 2015). Par ailleurs, il a été montré que les fonctions neuroprotectrices de BDNF passent par la stimulation de l'expression de l'enzyme glutamine synthétase et du transporteur GLAST dans les cellules de Müller (Dai et al. 2012).



## 2.4. Régénération

La réactivation des cellules de Müller en cas de dégénérescence rétinienne est aussi associée à un potentiel régénératif. Ce potentiel régénératif est très variable chez les différentes espèces de vertébrés. Chez le poisson, les cellules de Müller peuvent être considérées comme des cellules souches rétiniennes alors que leur potentiel régénératif est limité chez l'oiseau et encore plus limité chez les mammifères (Gallina, Todd, et al. 2014; Goldman 2014). C'est pourquoi, dans cette section, l'implication des cellules de Müller dans la régénération rétinienne est présentée par espèce.

Par ailleurs, le rôle des cellules gliales de Müller dans la régénération rétinienne a fait l'objet d'une revue bibliographique que nous avons publié dans *Developmental Dynamics* en 2016 et pour laquelle j'ai participé en tant que premier auteur. Cette revue (Hamon et al. 2016) est présentée en annexe de ce manuscrit.

### 2.4.1 Chez les poissons

#### ***Implication des cellules de Müller dans la neurogenèse rétinienne adulte***

Les modèles utilisés pour l'étude de la régénération rétinienne chez le poisson sont principalement le cyprin doré (poisson rouge) et le poisson zèbre. Certaines expériences sont également réalisées chez le médaka. Tous ces poissons sont des téléostéens. Ils ont une croissance continue tout au long de leur vie. C'est pourquoi leur rétine génère continuellement de nouveaux neurones. Les premières études de cette neurogenèse chez l'adulte ont montré qu'elle a lieu dans une zone germinale à la périphérie de la rétine (Johns 1977). Ce n'est que récemment que la présence de réelles cellules souches au niveau de la périphérie qui est appelée zone marginale ciliaire (ZMC) a été démontrée (Centanin et al. 2011). La ZMC n'est cependant pas le seul site de neurogenèse dans la rétine du poisson adulte. En effet, les nouveaux photorécepteurs de type bâtonnets sont générés à partir de cellules en prolifération résidant dans la couche nucléaire interne de la rétine centrale (Johns & Fernald 1981; Johns 1982; Julian et al. 1998; Otteson et al. 2001; Otteson & Hitchcock 2003). L'identité et l'origine de ces cellules est restée inconnue jusqu'en 2006 où des expériences de lignage ont formellement montré que ces cellules avaient pour origine les cellules gliales de Müller (Lenkowski & Raymond 2014). Ainsi dans la rétine adulte du poisson, les cellules de Müller se divisent lentement et génèrent des progéniteurs de bâtonnets qui permettent l'ajout de nouveaux bâtonnets à la rétine en croissance.

#### ***Implication des cellules de Müller dans la régénération de la rétine***

La première démonstration d'une régénération rétinienne efficace chez les poissons téléostéens a été effectuée chez le poisson rouge adulte après l'élimination chirurgicale d'un quart de la rétine (Lombardo 1968). De nombreuses études ont ensuite montré que l'ensemble des neurones manquant

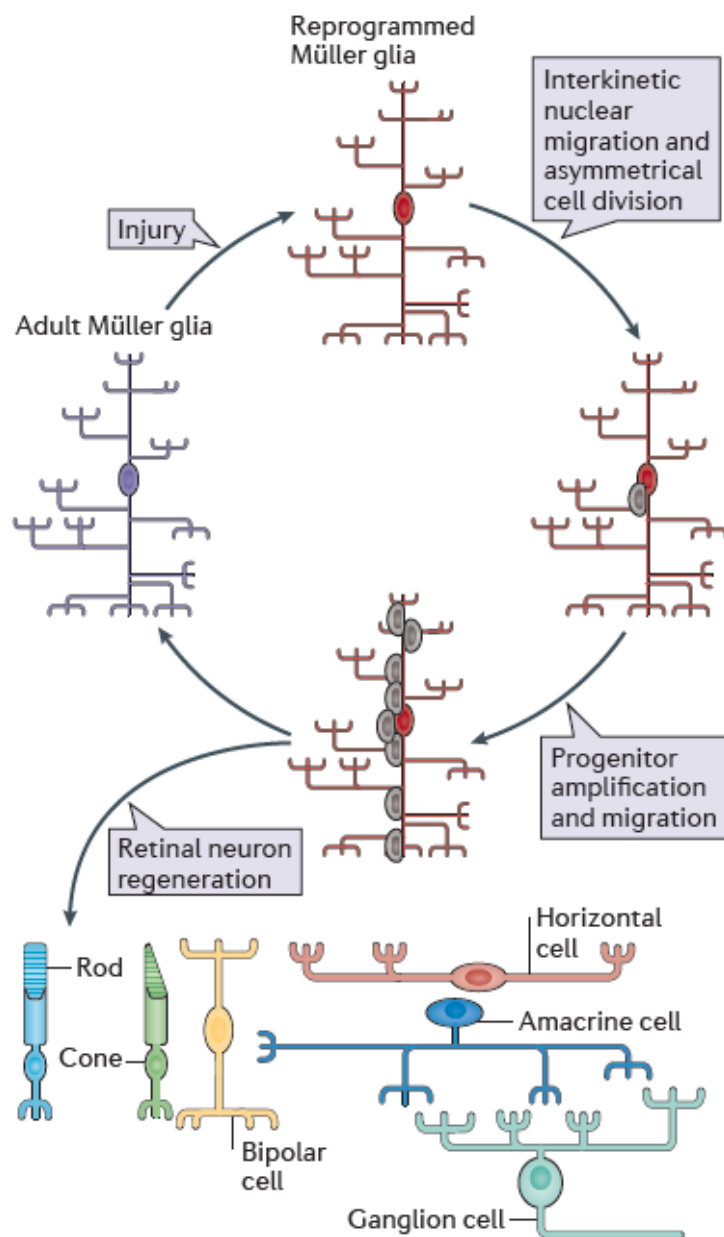


sont remplacés en cas de lésion. Différents types de lésion ont été testés pour ces expériences : les lésions cytotoxiques utilisant des drogues (Maier & Wolburg 1979; Raymond et al. 1988; Negishi et al. 1991; Tappeiner et al. 2013; Maurer et al. 2014; Powell et al. 2016), les lésions chirurgicales (Hitchcock et al. 1992) ou encore les lésions induites par la lumière ou un laser (Braisted et al. 1994; Vihtelic & Hyde 2000; Vihtelic et al. 2006; Kassen 2007; Thomas et al. 2012; Rajaram et al. 2014). Comme au cours de la neurogénèse adulte, deux sources cellulaires de régénération ont été trouvées, la CMZ et les cellules prolifératives de la couche nucléaire interne qui n'étaient pas encore identifiées comme étant des cellules gliales de Müller (Maier & Wolburg 1979; Raymond et al. 1988). Au début des années 2000, plusieurs études ont montré que les cellules de Müller étaient capables de répondre à une lésion tout particulièrement en augmentant leur prolifération (Vihtelic & Hyde 2000; Wu et al. 2001; Yurco & Cameron 2005; Raymond et al. 2006; Vihtelic et al. 2006). Plus tard, des expériences de traçage de lignées cellulaires ont permis de confirmer que les cellules de Müller sont la source majeure de cellules souches endogènes pour la régénération rétinienne chez le poisson (Fausett & Goldman 2006; Bernardos et al. 2007; Fimbel et al. 2007). Ainsi, bien que pour la croissance, les cellules de Müller ne forment que des bâtonnets, en cas de lésion, elles sont capables de générer tous les types de neurones pour assurer la régénération complète de la rétine (Stenkamp 2011).

### ***Comportement des cellules de Müller au cours de la régénération***

Les cellules de Müller répondent localement et rapidement à une lésion. Elles entrent tout d'abord en gliose réactive avant d'initier leur programme régénératif (Thomas et al. 2016). Les cellules de Müller du poisson zèbre adulte pouvant être considérées comme des cellules souches multipotentes, il est admis qu'elles ne nécessitent pas une reprogrammation à proprement parlé (Lenkowski & Raymond 2014). Elles subissent cependant de nombreux changements dans leur expression génique qui leur permettent de revenir à un état de type progéniteur (Goldman 2014; Sifuentes et al. 2016). Il faut noter toutefois qu'elles ne se différencient pas complètement. Certains facteurs de reprogrammation cellulaire bien connus comme *Ascl1*, *Lin-28* et *Stat3* ont été identifiés parmi les gènes dont l'expression est augmentée dans les cellules de Müller en réponse à une lésion (Kassen 2007; Fausett et al. 2008; Ramachandran et al. 2010; Sifuentes et al. 2016). Ces trois facteurs forment une cascade de régulation. *Ascl1* et *Stat3* se régulent positivement l'un-l'autre. De plus, *Ascl1* agit en amont de *Lin-28* qui lui inhibe le micro-ARN *let-7*, un répresseur de gènes associés à la régénération (Ramachandran et al. 2010; Nelson et al. 2012). Les facteurs neurogéniques *Sox2* et *Atoh7* sont également impliqués dans la réponse des cellules de Müller (Sifuentes et al. 2016; Gorsuch et al. 2017; Lust et al. 2016). Des expériences ont montré que *Sox2* est nécessaire à l'expression de *Ascl1* et *lin-28* mais pas à celle de *Stat3* (Gorsuch et al. 2017). Le facteur *Atoh7* semble être très important dans la réponse des cellules de Müller puisque son expression forcée suffit à déclencher un processus de





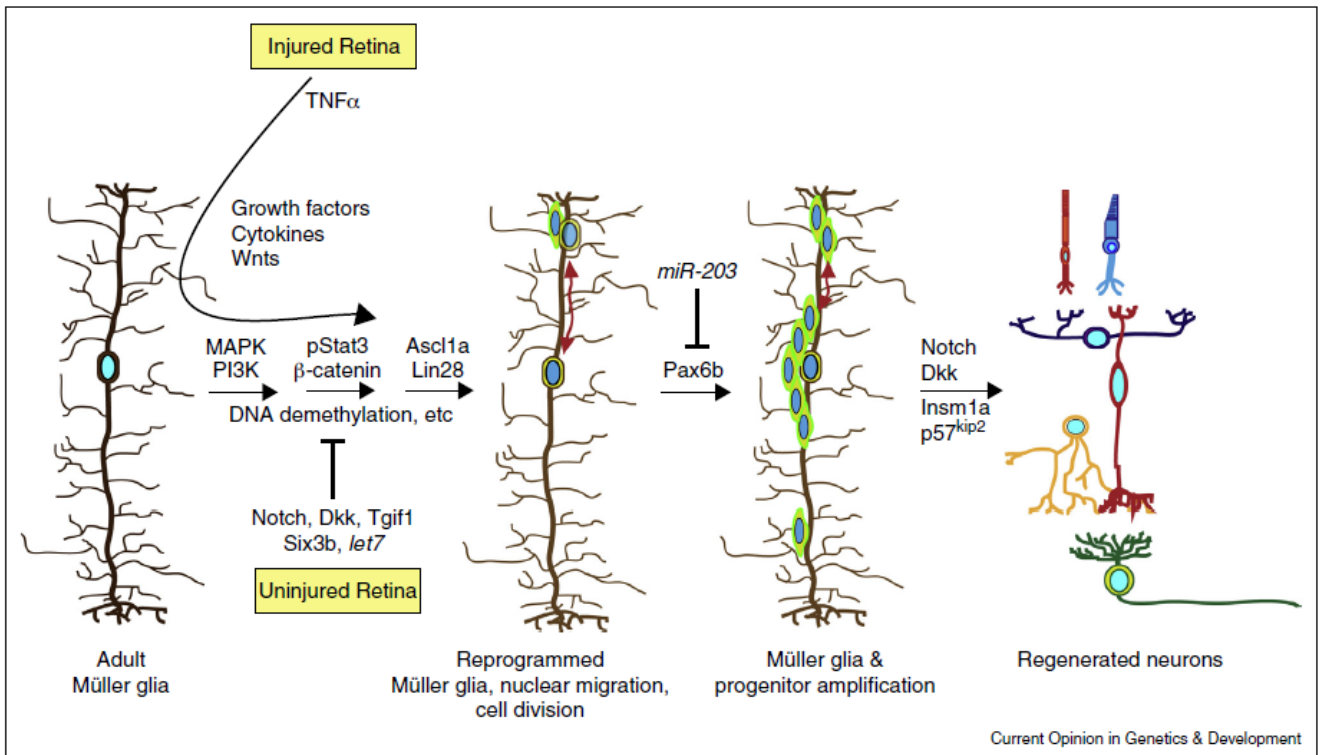
**Figure 16: Génération de progéniteurs multipotents dérivés des cellules de Müller pour la régénération de la rétine du poisson zèbre.** Les cellules de Müller du poisson zèbre répondent aux lésions de la rétine en reprogrammant leur génome (illustré par le changement de couleur de la cellule). Elles peuvent ainsi acquérir les propriétés de cellules souches. Cette reprogrammation résulte en une migration nucléaire intercinétique vers la couche nucléaire externe et une division asymétrique près de la membrane limitante externe. La division asymétrique génère un progéniteur qui va se multiplier. Les progéniteurs multipotents formés migrent dans toutes les couches de la rétine, sortent du cycle cellulaire et régénèrent tous les types de cellules rétinienne. D'après (Goldman et al 2014).

régénération dans la rétine en absence de lésion (Lust et al. 2016). Différentes études transcriptionnelles à partir de cellules de Müller isolées ont montré que des milliers de gènes sont différentiellement exprimés suite à une lésion, montrant la complexité du réseau de régulation intrinsèque de ces cellules au cours de la régénération (Qin et al. 2009; Qin & Raymond 2012; Sifuentes et al. 2016).

Le processus de dédifférenciation des cellules de Müller implique également des modifications épigénétiques. Il semblerait en effet que des changements de méthylation de l'ADN sous-tendent la réponse des cellules de Müller (Powell et al. 2013). De façon étonnante, cette étude a montré que les promoteurs des gènes de pluripotence sont déjà hypométhylés dans les cellules de Müller quiescentes. Cette information est toutefois cohérente avec l'idée selon laquelle les cellules de Müller conserveraient certaines caractéristiques de progéniteurs et seraient donc prêtes à ré-entrer dans le cycle cellulaire en cas de lésion. Cette hypométhylation facilite probablement le processus de dédifférenciation et permet donc une réponse rapide à une lésion de la rétine (Powell et al. 2013).

De manière semblable aux progéniteurs rétiniens au cours du développement, les cellules de Müller réactivées entament une migration nucléaire intercinétique. Leur noyau migre en effet vers le côté apical du tissu (couche nucléaire externe) pour entrer en mitose (Lahne et al. 2013; Nagashima et al. 2013). Les cellules de Müller subissent alors une seule division asymétrique leur permettant de s'auto-renouveler tout en générant un progéniteur rétinien (Figure 16) (Nagashima et al. 2013; Lenkowski & Raymond 2014). Le progéniteur ainsi formé se divise rapidement et de manière répétée pour générer un groupe de cellules progénitrices. Ces progéniteurs migrent le long des prolongements radiaux que les cellules de Müller dédifférenciées ont préservés. Ils se dirigent vers la couche de cellules qui est lésée et se différencient en le type cellulaire manquant (Fausett & Goldman 2006; Bernardos et al. 2007; Stenkamp 2011; Nagashima et al. 2013; Powell et al. 2016). Les progéniteurs qui se trouvent dans la couche cellulaire où les neurones ont été perdus ont un avantage prolifératif. Cela suggère que des signaux provenant des cellules survivantes pourraient forcer la régénération vers le type de neurones perdu (Sherpa et al. 2014; Powell et al. 2016).

La localisation et l'étendue de la zone d'activation des cellules de Müller ont été comparées dans plusieurs modèles de lésion touchant différents types cellulaires. Dans tous les cas, les cellules de Müller prolifèrent au niveau du site de lésion mais en fonction du type de lésions, la prolifération s'étend plus ou moins (Ng et al. 2014; Yurco & Cameron 2005). Il a été montré qu'il y a une corrélation entre la quantité de prolifération cellulaire et l'étendue de la mort des photorécepteurs (Vihtelic et al. 2006; Thomas et al. 2012). Dans les cas de dommages très sévères, il peut y avoir une surproduction de nouveaux neurones entraînant des défauts histologiques du tissu (Sherpa et al. 2014). Dans tous



**Figure 17: Voies de signalisation qui régulent la reprogrammation des cellules de Müller et la régénération de la rétine chez le poisson zèbre.** Représentation des principales voies de signalisation impliquées dans la régulation de la reprogrammation, prolifération des cellules de Müller et la différenciation des progéniteurs. D'après (Wan & Goldman 2016).

les cas, il n'y a pas seulement des neurones du type cellulaire lésé qui sont générés (Ng Chi Kei et al. 2017). Il a également été montré que la réponse des cellules de Müller est plus lente quand les cellules lésées sont des neurones de la rétine interne que quand ce sont des photorécepteurs (Nagashima et al. 2013). L'ensemble de ces observations suggère qu'en fonction du type et de l'étendue de la lésion, des signaux différents sont envoyés et que les cellules de Müller qui sont sensibles à ces différents signaux adaptent alors leur comportement.

### ***Signaux extrinsèques et voies de signalisation***

Bien que les mécanismes moléculaires régulant la réponse des cellules de Müller aux lésions soient encore mal connus, de nombreuses études ont permis ces dernières années l'identification de différents signaux extrinsèques et voies de signalisation impliqués dans ce processus (Figure 17). Les cellules apoptotiques de la rétine endommagée sont une source de molécules diffusibles. Il a été montré par exemple que, suite à un dommage, la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$  est sécrétée par les cellules lésées et active la dédifférenciation et la prolifération des cellules gliales de Müller (Nelson et al. 2013). De plus, les cellules de Müller répondent en augmentant leur propre expression de TNF $\alpha$  ce qui conduit secondairement à la génération d'une deuxième population de cellules de Müller en prolifération. Enfin, cette même étude a montré que TNF $\alpha$  est nécessaire à l'augmentation de l'expression de *Ascl1* et *Stat3* dans les cellules de Müller réactives (Nelson et al. 2013).

Un autre facteur impactant la régénération par les cellules de Müller est leur activité de phagocytose. En effet, les cellules de Müller répondent à la mort des photorécepteurs en phagocytant les débris des cellules apoptotiques (Morris et al. 2005; Thomas et al. 2016). Il a été montré que cette activité de phagocytose est essentielle pour déclencher la prolifération des cellules de Müller. Les mécanismes par lesquels l'inhibition pharmacologique de la phagocytose réduit la prolifération des cellules de Müller n'est pas encore connu mais semblent être indépendante de la régulation des gènes d'*Ascl1* et *Stat3* dont l'expression ne change pas (Bailey et al. 2010; Bejarano-Escobar et al. 2017).

Des études récentes ont démontré que les cellules de Müller sont une source de facteurs de croissance et de cytokines qui régulent leur propre réponse régénérative de manière autocrine (Wan et al. 2014; X.-F. Zhao et al. 2014). Ces molécules produites par les cellules de Müller comprennent des cytokines de la famille de l'interleukine-6 et des facteurs de croissance tels que l'insuline, l'*insulin-like growth factor-1*, le CNTF, le FGF et l'HB-EGF. Tous ces facteurs sont présents dans les cellules de Müller réactivées et non dans les quiescentes (Wan et al. 2014; X.-F. Zhao et al. 2014). Ces différents facteurs interagissent entre eux et convergent *via* les cascades de signalisation MAPK/ERK, PI3K/AKT et JAK/STAT sur la régulation de l'expression des gènes *Ascl1* et *Stat3* pour promouvoir la



dédifférenciation et la prolifération des cellules de Müller (Kassen et al. 2009; Wan et al. 2012; Wan et al. 2014; X.-F. Zhao et al. 2014).

Il a également été montré que les voies MAPK/ERK et PI3K/AKT activées par les cytokines et facteurs de croissance convergent sur la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Wan et al. 2014). Cette voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine est ainsi activée dans les cellules de Müller réactivées suite une lésion. Des études ont montré qu'elle est nécessaire à la dédifférenciation et à la prolifération de ces cellules gliales (Ramachandran et al. 2011; Meyers et al. 2012). Il existe une boucle de rétrocontrôle positif entre la voie de signalisation Wnt et *Ascl1*. ASCL1 inhibe l'expression de l'inhibiteur de la voie Wnt, Dkk, et stimule l'expression du ligand Wnt4a tandis que la voie Wnt promeut l'expression de *Ascl1* dans les cellules de Müller activées (Ramachandran et al. 2011). La répression de Dkk par ASCL1 semble se faire par l'intermédiaire du répresseur transcriptionnel Insm1 (Ramachandran et al. 2012; Gorsuch & Hyde 2014). Le rôle de Insm1 au cours de la régénération de la rétine semble être en réalité plus complexe car une étude a montré qu'il limite la réponse des cellules de Müller en régulant négativement l'expression de *hb-egf* (Ramachandran et al. 2012).

La voie de signalisation TGF $\beta$  est également impliquée dans le processus de régénération par les cellules de Müller (Lenkowski et al. 2013; Tappeiner et al. 2016). Cette voie TGF $\beta$  passant par les Smad2/3 inhibe la prolifération des cellules de Müller. Cependant, son rôle est plus complexe et dépend des phases du processus de régénération. Il semble en effet que dans un premier temps, une activation de la voie TGF $\beta$  soit importante pour la réactivation des cellules de Müller. Dans un deuxième temps, l'inhibition de cette même voie par les corépresseurs Tgif1 et Six3b est nécessaire pour promouvoir la prolifération des cellules de Müller. Enfin dans un troisième temps, la voie de signalisation TGF $\beta$  promeut la différenciation des progéniteurs dérivés des cellules de Müller (Lenkowski et al. 2013; Tappeiner et al. 2016). De la même façon, il a récemment été montré que l'inhibition de la signalisation liée au neurotransmetteur GABA est importante pour l'entrée en prolifération des cellules de Müller en réponse à la mort des photorécepteurs. L'inhibition pharmacologique ou génétique du récepteur GABA<sub>A</sub> permet de stimuler la prolifération des cellules de Müller en l'absence de lésion (Rao et al. 2017). Dans la rétine, les photorécepteurs libèrent du glutamate vers les cellules horizontales GABAergiques. Quand les photorécepteurs meurent, ils ne stimulent plus la libération de GABA par les cellules horizontales et le niveau extracellulaire de GABA diminue. Ainsi, les auteurs de cette étude proposent que les cellules de Müller détectent la diminution du niveau de GABA de l'environnement et initie la régénération en réponse (Rao et al. 2017). La diminution de GABA extracellulaire serait donc un signal envoyé indirectement aux cellules de Müller par les photorécepteurs lésés.



Le rôle de la voie de signalisation Notch dans la régulation de la réponse des cellules de Müller est complexe et encore controversé. Il semble que sa fonction varie en fonction des espèces. Des études chez le poisson zèbre ont montré que la voie Notch exerce un rétrocontrôle négatif sur la réponse des cellules de Müller. En réponse à une lésion, elle est activée par la cascade de signalisation HB-EGF/MAPK/ASCL-1 et inhibe en retour l'expression de *Stat3*, *Ascl1* et *hb-egf* (Wan et al. 2012). Une autre équipe a montré que l'inhibition de la voie Notch permet d'induire la prolifération des cellules de Müller dans la rétine en l'absence de lésion. Les auteurs proposent que le rôle de la voie Notch soit de préserver un pool de cellules de Müller quiescentes dans la rétine endommagée. Cela permettrait un réglage précis du nombre de cellules de Müller capables de proliférer, en adéquation avec la gravité et l'étendue de la lésion (Conner et al. 2014). De façon contradictoire, une étude chez le médaka a montré que l'activation de la voie Notch entraîne une augmentation de la prolifération des cellules de Müller de façon semblable à ce qui a été décrit chez les oiseaux et les rongeurs (Lust et al. 2016; Del Debbio et al. 2010; Ghai et al. 2010; Hayes et al. 2007). Par ailleurs, il semble y avoir des différences dans la régulation de la voie de signalisation Notch entre les cellules de Müller d'une même rétine (Wan & Goldman 2017). En effet, une étude chez le poisson zèbre a montré que Notch est différemment régulé en fonction de la localisation des cellules suggérant qu'il existe deux populations différentes de cellules de Müller. Dans les cellules de Müller de la rétine centrale, une augmentation de *Fgf8a*, un facteur en amont de Notch, conduit à une augmentation de Notch alors que dans les cellules de Müller périphériques, l'augmentation de *Fgf8a* entraîne l'inhibition de la voie Notch. Cette différence entre les cellules de Müller de la rétine centrale et périphérique semble relater une différence liée à l'âge des cellules, celles de la périphérie étant plus jeunes car ajoutées au cours de la croissance continue. Les disparités entre ces deux populations de cellules de Müller pourraient impacter le processus de régénération. Cependant, les expériences ont montré qu'une inhibition de Notch permet la réactivation des cellules de Müller des deux populations (Wan & Goldman 2017). C'est donc bien la régulation de la voie Notch et non sa fonction qui est différente dans ces deux populations.

Le déclenchement de la prolifération des cellules de Müller est un évènement clé du processus de régénération mais l'arrêt de la division cellulaire n'en est pas moins important pour éviter une expansion incontrôlée des cellules progénitrices. Dans la rétine du poisson zèbre, la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs est en partie régulée par *Insm1* qui stimule l'expression de *p57kip2*, un inhibiteur des kinases cycline-dépendantes (Ramachandran et al. 2012).





#### **2.4.2 Chez les amphibiens**

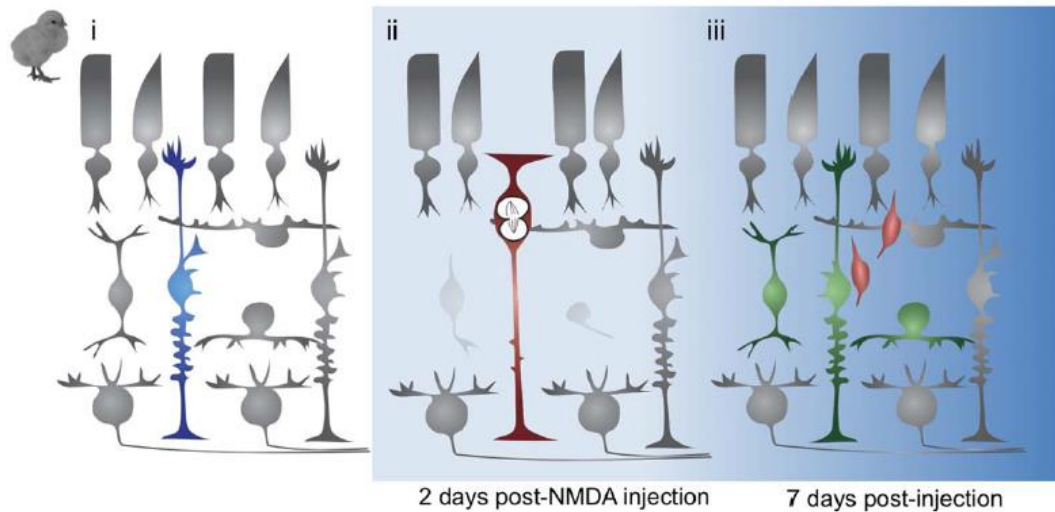
Les urodèles, comme le triton et la salamandre, ont la capacité de régénérer leur organes, y compris la rétine, après ablation (Mitashov 1996). Les anoures, comme la grenouille, sont moins connus dans le domaine de la régénération car leurs capacités de régénération sont limitées aux stades larvaires et disparaissent après la métamorphose (Hitchcock et al. 2004). Ces amphibiens adultes ne sont pourtant pas totalement dénués de capacités régénératives puisqu'il a été montré en 2007 que le xénope retient la capacité de régénérer sa rétine après la métamorphose (Yoshii et al. 2007). Différentes études réalisées sur la régénération de la rétine chez les amphibiens ont montré que les sources de cellules pour former les nouveaux neurones sont les cellules de l'EPR et de la zone marginale ciliaire (Vergara & Del Rio-Tsonis 2009; Hidalgo et al. 2014; Miyake & Araki 2014). Les cellules de Müller des amphibiens sont quiescentes contrairement à celles des poissons qui prolifèrent lentement en conditions physiologiques pour former des bâtonnets. Les premières évidences d'une implication des cellules de Müller dans la régénération de la rétine chez les amphibiens ont été apportées par l'observation de cellules de Müller en prolifération chez le triton suite à un détachement rétinien (Grigorian & Poplinskaia 1999; Novikova et al. 2008). Dans un modèle d'ablation des bâtonnets par la nitroréductase, une étude a montré que les cellules de Müller deviennent hypertrophique mais les auteurs n'ont pas observé de réentrée dans le cycle cellulaire de ces mêmes cellules (Choi et al. 2011). Une étude récente effectuée dans notre laboratoire a montré que les cellules de Müller sont capables de proliférer et régénérer de nouveaux photorécepteurs dans deux modèles de lésion, un modèle de lésion mécanique localisé et un modèle d'ablation inductible des bâtonnets par la nitroréductase. De manière intéressante, il semble que l'âge des xénopes impacte sur l'ampleur de la réponse des cellules de Müller. La réponse des cellules de Müller est en effet plus étendue chez les têtards âgés et chez l'adulte que chez les jeunes têtards (Langhe et al. 2017).

Les différences de réponses des cellules de Müller observées entre les différents modèles suggèrent que comme chez les poissons, la réponse des cellules de Müller varie en fonction de l'étendue de la lésion. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires régissant la réactivation des cellules gliales de Müller chez l'amphibien n'ont pas encore été étudiés.

#### **2.4.3 Chez les oiseaux**

##### ***Implication des cellules de Müller dans la régénération de la rétine***

Le modèle prédominant dans l'étude de la rétine chez l'oiseau est le poulet et plus particulièrement le poussin. Il a longtemps été admis que la rétine post-embryonnaire du poulet était incapable de régénérer jusqu'à ce que soit découvert en 2000 une région neurogénique semblable à la zone marginale ciliaire (ZMC) du poisson et des amphibiens (Reh & Pittack 1995; Fischer & Reh 2000).



**Figure 18: Réponse des cellules de Müller à la dégénérescence induite par le NMDA dans la rétine de poulet.** i Chez le poulet, une sous population de cellules de Müller (en bleu) a la capacité de ré-entrer dans le cycle cellulaire en réponse à une lésion. ii Des dommages sévères de la rétine induits par le NMDA entraînent l'apoptose des cellules amacrine et bipolaires et en conséquence la différenciation et la prolifération de quelques cellules de Müller (en rouge). Ces cellules de Müller activées subissent une migration nucléaire intercinétique, leur noyau étant dans la couche nucléaire externe quand ils entrent en mitose. iii Les cellules de Müller en prolifération s'auto renouvellent et génèrent des cellules amacrine et bipolaires (en vert). Cependant, la plupart des cellules nouvellement formées restent dans un état indifférencié semblable à celui de progéniteurs (en rouge). D'après (Hamon et al 2016).

Cependant, contrairement à la ZMC du poisson, chez le poulet cette région ne contribue pas à la régénération de la rétine suite à une lésion même si elle est stimulée par des facteurs de croissance exogènes (Fischer 2005; Fischer et al. 2013). La régénération de plusieurs types de neurones a pourtant été montrée dans un modèle de lésion neurotoxique sévère chez le poussin. Des cellules en prolifération ont été observées dans la rétine centrale et ont été identifiées comme étant des cellules de Müller (Fischer & Reh 2002). Cette étude a montré pour la première fois que les cellules de Müller du poussin sont capables de ré-entrer dans le cycle cellulaire, de se différencier en progéniteurs rétiniens et de générer de nouveaux neurones ainsi que des cellules de Müller (Figure 18) (Fischer & Reh 2002). Les cellules de Müller activées sont capables de générer les différents types de neurones en fonction du type cellulaire lésé. Par exemple, il a été montré que les cellules amacrines et bipolaires sont régénérées après leur destruction par la neurotoxine N-méthyl-D-aspartate (NMDA). De la même façon, les cellules ganglionnaires détruites par injection de toxines comme la colchicine ou l'acide kaïnique sont régénérées à partir des cellules de Müller (Fischer & Reh 2002). Les modèles de dégénérescence des photorécepteurs étant peu développés chez le poulet, il n'est pas facile de déterminer si les cônes et les bâtonnets peuvent être régénérés à partir des cellules gliales de Müller chez cette espèce. Il a été montré dans un modèle de détachement rétinien que les cellules de Müller ré-entrent dans le cycle cellulaire suite à la perte des photorécepteurs mais il n'a pour l'instant pas été déterminé si elles sont capables de générer de nouveaux photorécepteurs (Cebulla et al. 2012).

### ***Signaux extrinsèques et voies de signalisation***

Différents signaux impliqués dans la réponse des cellules de Müller ont récemment été identifiés dans la rétine endommagée. Les neurones lésés produisent certainement des facteurs qui stimulent la réponse régénérative des cellules de Müller. Cependant, d'autres sources potentielles de molécules diffusibles comme les cellules microgliales et les macrophages ont fait l'objet d'études. L'habilité des cellules de Müller à phagocyter n'a pas été démontrée chez le poulet. En revanche, il a été montré que la microglie et les macrophages sont activés et fonctionnent comme des phagocytes afin d'éliminer les débris des cellules mourantes en cas de lésion (Fischer et al. 2014). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'activation de la microglie et des macrophages stimule la différenciation et l'entrée dans le cycle cellulaire des cellules de Müller. Les signaux engagés dans cette relation n'ont pas été identifiés mais les auteurs proposent que des éléments du système du complément et des cytokines pro-inflammatoires pourraient être impliqués (Fischer et al. 2014).

D'autres signaux extrinsèques stimulant l'activation des cellules de Müller pourraient provenir de cellules gliales atypiques qui ont été identifiées dans la rétine de poulet et qui sont appelées cellules gliales non astrocytaires de la rétine interne ou NIRG (pour nonastrocytic inner retinal glial cells en



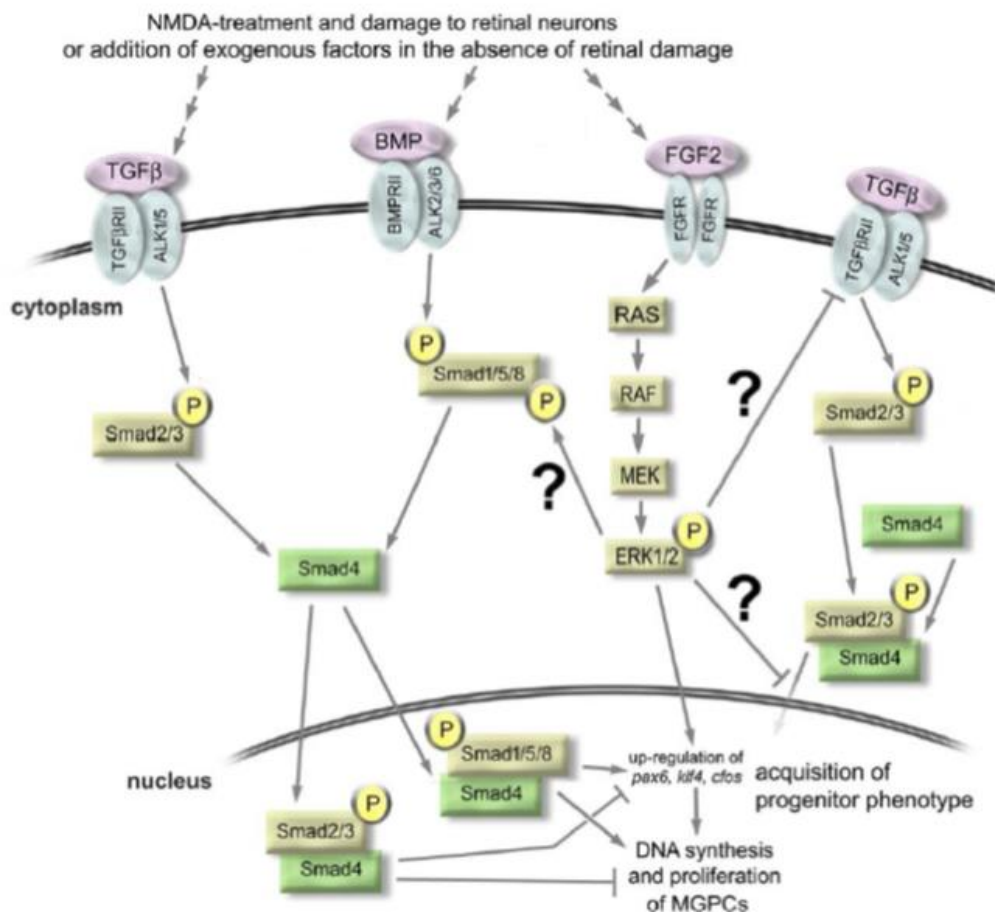
anglais) (Fischer & Bongini 2010). Il a en effet été montré que des dommages sévères de la rétine conduisent à leur accumulation, leur réactivation et leur migration. Le comportement des NIRG semble en fait être lié à celui des cellules de la microglie (Zelinka et al. 2012).

La réponse inflammatoire des cellules de Müller pourrait également influencer leur propre reprogrammation (Gallina, Zelinka, et al. 2014). Une étude récente a en effet montré que les récepteurs aux glucocorticoïdes, qui ont habituellement un effet anti-inflammatoire, inhibent la réactivation des cellules de Müller. Ces récepteurs sont exprimés par les cellules de Müller et sont régulés de manière dynamique suite à une lésion. Leur expression est initialement diminuée et par la suite augmentée. Ainsi, la chute transitoire de la signalisation liées aux récepteurs de glucocorticoïdes juste après la lésion pourrait être nécessaire pour l'entrée en prolifération des cellules de Müller (Gallina, Zelinka, et al. 2014).

La réponse des cellules de Müller en cas de lésion est également dépendante des niveaux de facteurs de croissance sécrétés. Certaines facteurs de croissance ou combinaisons de facteurs de croissance exogènes, comme l'HB-EGF, l'insuline + FGF2 ou le CNTF + FGF2, sont capables de stimuler la dédifférenciation et la prolifération des cellules de Müller de façon synergique (Fischer & Reh 2002; Fischer et al. 2002; Todd et al. 2015). L'action de FGF2 passe par la voie de signalisation MAPK et agit directement sur les cellules de Müller alors que l'insuline semble agir de manière indirecte en activant la microglie et les NIRG qui à leur tour stimulent la prolifération des cellules de Müller (Andy J. Fischer et al. 2009; Fischer et al. 2010; Gallina, Todd, et al. 2014). Chez le poulet, FGF2 est le seul facteur connu à ce jour qui est capable de stimuler la régénération en l'absence de lésion (Ghai et al. 2010; Gallina, Zelinka, et al. 2014; Fischer et al. 2014). Un étude a montré que l'activation des récepteurs FGF et de la voie de signalisation MAPK/ERK est indispensable à la prolifération et à la dédifférenciation des cellules de Müller en progéniteurs en réponse à un dommage (Andy J Fischer et al. 2009).

Le rôle de la voie Notch dans la réponse des cellules de Müller chez le poulet semble être complexe comme chez le poisson. Il semble que la voie de signalisation Notch soit nécessaire pour la dédifférenciation et la prolifération des cellules de Müller en réponse à un dommage (Hayes et al. 2007; Ghai et al. 2010). En revanche, elle a un effet négatif sur les étapes ultérieures et est détrimentaire pour l'achèvement du processus de régénération (Hayes et al. 2007).

D'autres voies de signalisation impliquées dans la réponse des cellules de Müller chez le poisson zèbre ont été étudiées récemment chez le poulet. Ainsi, différentes études ont montré que les voies de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, JAK/STAT, Hedgehog, mTor et BMP/SMAD sont toutes impliquées dans la réponse des cellules de Müller et nécessaire à leur dédifférenciation et à leur prolifération. En effet, dans tous les cas, l'inhibition d'un ou plusieurs acteurs de la voie de signalisation empêche la formation



**Figure 19: Schéma résumant la signalisation dans les cellules de Müller et les progéniteurs dérivés des cellules de Müller dans la rétine de poulet.** Le schéma montre les interactions potentielles entre les voies de signalisation TGFβ/Smad2, BMP/Smad1/5/8 et FGF2/MAPK et les sites d'action des différents stimuli. Les points d'interrogation indiquent les interactions non confirmées. La voie de signalisation BMP4/Smad1/5/8 stimule la formation de progéniteurs dérivés des cellules de Müller alors que la signalisation via TGFb/Smad2/3 au contraire l'inhibe. D'après (Todd et al 2017).

de progéniteurs dérivés des cellules de Müller (Gallina et al. 2016; Todd et al. 2016; Todd & Fischer 2015; Zelinka et al. 2016; Todd et al. 2017). A l'inverse, comme chez le poisson, la voie de signalisation TGF $\beta$ /SMAD2/3, elle, inhibe la formation de progéniteurs à partir des cellules de Müller (Figure 19) (Todd et al. 2017). La régulation des étapes ultérieures du processus de régénération n'est que très peu connue. Il a néanmoins été montré que la voie JAK/STAT inhibe la différenciation neuronale des progéniteurs (Todd et al. 2016).

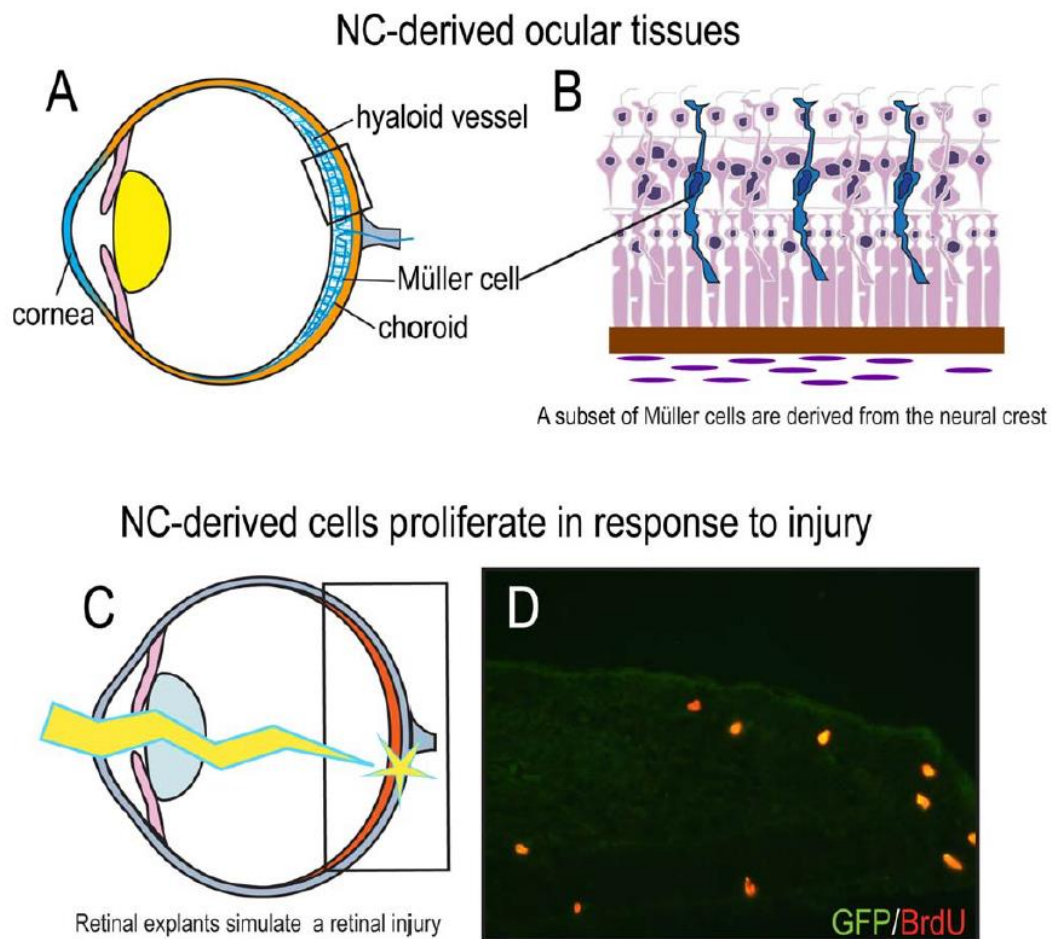
Ces voies de signalisation interagissent et sont parfois dépendantes les unes des autres. Il semble que la voie des MAPK activée par les récepteurs aux FGF soit centrale dans ce réseau de signalisation régulant la réponse des cellules de Müller en réponse aux lésions. Il a été en effet montré que la voie FGF2/MAPK active des composants de la voie Notch et rend les cellules de Müller sensibles à la signalisation Hedgehog (Ghai et al. 2010; Todd & Fischer 2015). Il a également été montré que la voie FGF2/MAPK active la voie Wnt/  $\beta$ -caténine (Gallina et al. 2016). Enfin, les voies de signalisation mTor, BMP et TGF $\beta$  semblent elles aussi agir en aval de FGF2/MAPK (Figure 19) (Todd et al. 2017; Zelinka et al. 2016).

#### **2.4.4 Chez les mammifères**

##### ***Potentiel neurogénique des cellules de Müller***

Pendant longtemps les scientifiques ont estimé que les cellules de Müller des mammifères étaient capables d'entrée en gliose réactive en réponse à une lésion mais pas de participer à la régénération. Cette vision des choses a évolué il y a une dizaine d'années quand des chercheurs ont montré que les cellules de Müller de mammifères étaient, elles aussi, capables de proliférer en réponse à un dommage de la rétine. Chez le rat, des modèles de dégénérescence sévère reposant sur l'utilisation de molécules neurotoxiques comme le NMDA, le MNU, le NaIO<sub>3</sub> et l'ouabaine ou sur la surexposition à la lumière, ont permis d'observer la prolifération d'une partie des cellules de Müller (Ooto et al. 2004; Wan et al. 2008; Wan et al. 2007). Les résultats chez la souris sont moins homogènes puisque des études ont montré la présence de cellules de Müller en prolifération dans des modèles de dégénérescence induite par NMDA, MNU ou exposition à la lumière alors que d'autres études n'ont pas observé de prolifération *in vivo* sans apport exogène de facteurs de croissance (Karl et al. 2008; Joly et al. 2011; Kugler et al. 2015). Il semble donc que la réponse proliférative des cellules de Müller soit plus importante chez le rat que chez la souris mais dans tous les cas elle reste très limitée. Dans beaucoup d'études, le processus de régénération impliquant les cellules de Müller s'arrête à la réentrée dans le cycle cellulaire et ne va pas jusqu'à la re-différenciation en neurone. Cependant, certaines études ont permis de mettre en évidence la formation de nouveaux neurones. En 2004, une étude a montré que quelques cellules de Müller étaient capables de se différencier, proliférer et générer de nouvelles





**Figure 20: Schéma représentant les tissus oculaires dérivés de la crête neurale et leur réponse en cas de lésion. (A)** Coupe sagittale d'un œil. Les noms indiquent les structures dérivant de la crête neurale (B) Agrandissement montrant les tissus rétiniens dérivés de la crête neurale à savoir une sous-population de cellules de Müller. (C) Modèle de lésion de la rétine par mise en culture d'explants rétiniens. (D) Dans les explants de rétine de souris *Wnt1Cre:R26RGFP/1*, les cellules GFP positives sont les cellules issues de la crête neurale. Ce sont ces cellules GFP positives qui sont BrdU positives. D'après (Liu et al 2014).

cellules bipolaires et de nouveaux bâtonnets dans un modèle de dégénérescence induite par le NMDA chez le rat (Ooto et al. 2004). La génération de nouveaux photorécepteurs a également été rapportée dans un modèle de dégénérescence induite par le MNU toujours chez le rat (Wan et al. 2008) et également dans des explants rétiniens, un système où la dégénérescence des photorécepteurs est spontanée, chez le rat et la souris (Osakada et al. 2007). Il a tout de même été montré *in vivo* chez la souris que l'ajout de facteurs de croissance permet aux cellules de Müller d'acquiescer la capacité de proliférer et générer de nouvelles cellules amacrines dans le modèle de dégénérescence induite par le NMDA (Karl et al. 2008). Bien que le nombre de neurones formés dans ces différents modèles reste faible, l'ensemble de ces études a permis de valider le potentiel régénératif des cellules de Müller de mammifères. Un potentiel qui pourrait être stimulé dans une optique thérapeutique.

Des études *in vitro* ont montré que les cellules de Müller murines et humaines en culture sont capables de générer à la fois des cellules gliales et des neurones (Das et al. 2006; Lawrence et al. 2007; J. J. Zhao et al. 2014). De manière intéressante, il a été montré que les cellules de Müller humaines en culture se différencient en bâtonnets six fois plus vite que des cellules souches pluripotentes (Giannelli et al. 2011). Quand ils sont transplantés dans une rétine déplétée de photorécepteurs ou de cellules ganglionnaires, ces neurones dérivés de cellules de Müller s'intègrent dans la bonne couche de la rétine et permettent une amélioration fonctionnelle des cellules concernées (Singhal et al. 2012; Jayaram et al. 2014).

Comme mentionné précédemment, une étude récente a suggéré qu'une sous population de cellules de Müller de la rétine de souris dériverait des cellules de la crête neurale (Liu et al. 2014). Cette information qui n'a pas été confirmée depuis est assez surprenante. Elle est en contradiction avec les résultats de la plupart des études de lignage de la crête neurale et avec de précédentes études montrant que les cellules de Müller dérivent exclusivement du neuro-épithélium rétinien. Néanmoins, les auteurs ont montré qu'en réponse à une lésion, ce sont ces cellules dérivées de la crête neurale qui prolifèrent mettant en avant la possibilité que le potentiel de régénération d'une sous-population de cellules de Müller uniquement puisse être associé au fait qu'elles dérivent de la crête neurale (Figure 20) (Liu et al. 2014).

### **Reprogrammation des cellules de Müller**

La réponse régénérative des cellules de Müller est limitée et inefficace, c'est pourquoi il est difficile de l'étudier *in vivo*. Une récente étude *ex vivo* a en revanche permis d'étudier le comportement des cellules de Müller en réponse à la dégénérescence entraînée par la mise en culture d'explants rétiniens (Löffler et al. 2015). Dans ces explants, les cellules de Müller présentent différents états qui correspondent aux phases majeures du processus régénératif décrit chez le poisson et le poulet. A



partir d'un état quiescent, elles se reprogramment / dédifférencient, prolifèrent et génèrent des descendants neuronaux. Dans ce modèle, grâce à l'ajout de facteurs de croissances, plus de la moitié des cellules de Müller ré-entrent dans le cycle cellulaire (Löffler et al. 2015).

Au vu de son rôle clé chez le poisson, le facteur neurogénique *Ascl1* a rapidement été envisagé comme potentiel acteur de la reprogrammation des cellules de Müller chez les mammifères. Une étude a montré que l'expression de *Ascl1* n'est pas augmentée dans le modèle de dégénérescence induite par le NMDA chez la souris (Karl et al. 2008). Cependant, une étude sur des explants rétiniens a montré que l'expression de *Ascl1* est augmentée en réponse à la perte des neurones mais seulement dans une partie des cellules de Müller et dans les explants issus de souris jeunes (Löffler et al. 2015). De manière intéressante, cette étude *ex vivo* a montré que la différence d'expression de *Ascl1* en fonction de l'âge corrèle avec le fait que les cellules de Müller des jeunes souris présentent un plus grand potentiel régénératif que celles des souris plus âgées (Löffler et al. 2015). De plus, des expériences ont montré que la surexpression de *Ascl1* est suffisante pour reprogrammer des cellules de Müller de souris *in vitro* et activer leur différenciation neuronale (Pollak et al. 2013). Plus récemment, des études *in vivo* ont montré que la surexpression de *Ascl1* n'est pas suffisante pour modifier le comportement des cellules de Müller en absence de lésion. En revanche, cela stimule la réentrée dans le cycle cellulaire et le potentiel neurogénique des cellules de Müller quand la rétine est endommagée (Yumi Ueki et al. 2015). Dans cette étude aussi la réponse des cellules de Müller est plus efficace chez les souris les plus jeunes. L'ensemble de ces résultats suggère que l'absence d'activation de l'expression de *Ascl1* pourrait être un des facteurs limitant le potentiel régénératif des cellules de Müller chez les mammifères adultes. Ainsi, une des potentielles différences entre les cellules de Müller des poissons et celles des mammifères pourrait être les niveaux d'expression du facteur de transcription *ASCL1*.

*Lin-28* est un autre facteur de reprogrammation étudié pour son implication dans le processus régénératif. Alors que son expression est augmentée en réponse à une lésion chez le poisson (Kassen 2007), il a été montré qu'elle est au contraire diminuée en cas de dégénérescence chez le rongeur (Z. Tao et al. 2016). Cette diminution de l'expression de *Lin-28* pourrait être un autre des facteurs limitant la dédifférenciation des cellules de Müller chez les mammifères. Il a en effet été montré que l'expression forcée de *Lin-28* suffit à stimuler la prolifération des cellules de Müller en absence de lésion chez la souris (Yao et al. 2016) et permet même une amélioration de la fonction visuelle des rats RCS, un modèle génétique de rétinite pigmentaire (Z. Tao et al. 2016). Par ailleurs, des études suggèrent l'implication du facteur neurogénique *Atoh7* dans le processus de régénération. Il a été montré chez le rat dans un modèle de glaucome, où les cellules perdues sont les cellules ganglionnaires, que la surexpression d'*Atoh7* permet de promouvoir la différenciation des progéniteurs dérivés des cellules de Müller en cellules ganglionnaires (Song et al. 2015).



Un aspect très important de la reprogrammation des cellules de Müller est sa régulation épigénétique. En effet, la perte du potentiel neurogénique chez les cellules de Müller adulte est accompagnée d'une diminution d'accessibilité de la chromatine suggérant que des facteurs épigénétiques limitent le potentiel régénératif (Jorstad et al. 2017). De manière intéressante, il a été montré que plusieurs facteurs de remodelage de la chromatine sont différentiellement exprimés entre des lignées de souris présentant des réponses prolifératives différentes en réponse à une lésion (Suga et al. 2014). Par ailleurs, il a été montré que la reprogrammation des cellules de Müller déclenchée par la surexpression de *Ascl1* implique des modifications de la chromatine au niveau de gènes cibles de *ASCL1* pour la faire passer d'une forme répressive à une forme active (Pollak et al. 2013). De plus, plus récemment il a été montré que l'inhibition des histones désacétylases potentialise l'effet de la surexpression de *Ascl1* permettant aux cellules de Müller adultes de régénérer des neurones fonctionnels dans un modèle de dégénérescence induite au NMDA (Jorstad et al. 2017). Enfin, une étude récente a montré que l'expression du gène de pluripotence *Oct4* est augmentée suite à une lésion mais que rapidement ensuite le gène est éteint par méthylation de l'ADN. Les auteurs proposent que la dédifférenciation des cellules de Müller pourrait être limitée par une méthylation répressive (hyperméthylation) des gènes de pluripotence (Reyes-Aguirre & Lamas 2016). De manière intéressante, une précédente étude a, elle, montré que les gènes de pluripotence, y compris *Oct4*, sont hypométhylés dans les cellules de Müller quiescentes suggérant qu'elles sont prêtes à être reprogrammées (Powell et al. 2013). Au vu des résultats de ces deux études, il semble donc que la méthylation de l'ADN est une régulation dynamique de l'expression des gènes en réponse à une lésion. Si la méthylation des gènes de reprogrammation est permissive à l'état basal dans les cellules de Müller, il semble que, assez rapidement après le début de la dégénérescence, elle devienne répressive limitant ainsi le potentiel neurogénique des cellules de Müller des mammifères. Ceci pourrait représenter une différence par rapport aux poissons où les gènes de pluripotence comme *Ascl1* semblent rester hypométhylés au cours de la régénération. Une étude récente a cependant mis en évidence, chez la souris, que la protéine APOBEC1 dont le niveau est augmenté dans une rétine traitée au NMDA et à l'EGF, pourrait stimuler la reprogrammation des cellules de Müller en diminuant la méthylation de gènes neurogéniques comme *Nestin* (Xiao et al. 2017).

### ***Signaux extrinsèques et voies de signalisation***

L'identification de facteurs qui pourraient être utilisés pour réactiver et stimuler le potentiel régénératif des cellules de Müller des mammifères est un enjeu primordial. De nombreuses études s'appliquent donc à essayer de mieux comprendre le réseau de signalisation mis en jeu dans la réactivation des cellules de Müller en réponse à une lésion.

	Age	Damage > proliferation	GFs > proliferation	Strain difference	TFs > neurons
Rat	Adult	Very low	Shh, Wnt	No data	NeuroD, Math3
	Post-natal	Yes	EGF, FGF Shh, Wnt	No data	No data
Mouse	Adult	Extremely low	EGF, FGF, Insulin, Wnt	Yes	No data
	Post-natal	Yes	EGF, Wnt	No data	Ascl1
Chick	Post-hatch	Yes	EGF, FGF, insulin, IGF, Notch	No data	No data

**Figure 21: Stimulation de la prolifération des cellules de Müller par des facteurs exogènes.** Différences dans les réponses régénératives des cellules de Müller en fonction de l'espèce et de l'âge. Les colonnes indiquent : si la prolifération des cellules de Müller est observée après une lésion ; quels facteurs de croissances ou molécules exogènes ont été identifiés comme pouvant améliorer la réponse proliférative ; s'il y a des différences observées en fonction des lignées d'une même espèce ; et quels facteurs de transcription sont connus pour entraîner la formation de nouveaux neurones dérivés des cellules de Müller. D'après (Wilken & Reh 2016).

La libération de glutamate par les neurones lésés pourrait servir de signal pour activer les cellules de Müller. Il a en effet été montré que des niveaux sub-toxiques de glutamate sont suffisants pour stimuler la réentrée dans le cycle cellulaire des cellules de Müller et induire la neurogénèse chez la souris (Takeda et al. 2008). Les endothélines et l' $\alpha$ -aminoadipate sont d'autres molécules sécrétées dans la rétine lésée qui semblent servir de signal d'activation des cellules de Müller (Harun-Or-Rashid et al. 2016; Takeda et al. 2008).

Par ailleurs, comme chez le poisson et le poulet, la prolifération des cellules de Müller des rongeurs peut être largement stimulée par de nombreux facteurs de croissance exogènes comme le FGF, l'EGF, l'IGF (Insulin-like Growth Factor) ou le NGF (Nerve Growth Factor) (Figure 21) (Ooto et al. 2004; Close et al. 2006; Karl et al. 2008; Fischer & Bongini 2010; Wang et al. 2016; Wilken & Reh 2016; Sardar Pasha et al. 2017). Tous ces facteurs sont des molécules qui peuvent être sécrétées *in vivo* par les cellules de Müller. Leurs mécanismes d'action et les cascades génétiques impliquées en aval ne sont pas bien connus. Quelques études ont cependant essayé de déterminer les mécanismes moléculaires déclenchés par l'EGF. Il a ainsi été montré que l'activation des voies de signalisations MAPK/ERK et PI3K/AKT est nécessaire pour que les cellules de Müller prolifèrent en réponse à l'EGF (Ueki & Reh 2013; Beach et al. 2017). La voie de signalisation BMP/Smad est également activée par la voie de l'EGF, en aval de la voie PI3K/AKT, et est essentielle pour la prolifération des cellules de Müller (Ueki & Reh 2013). Par ailleurs, une étude récente a montré que le traitement à l'EGF d'explants rétiniens entraîne une augmentation de l'expression de gènes associés à la prolifération comme *Ccnd1* codant pour la cycline D1 et de gènes de la reprogrammation comme *Ascl1* et *Neurog2* (Schäfer & Karl 2017). Une autre étude a analysé le mode d'action du NGF. Ce facteur stimule la production de VEGF et promeut la prolifération des cellules de Müller via les voies MAPK/ERK et PI3K/AKT (Wang et al. 2016). Ainsi, il semble que, comme chez le poisson, différents signaux activateurs convergent vers les cascades de signalisations MAPK/ERK et PI3K/AKT dans les cellules de Müller.

Différentes études ont montré que les potentiels prolifératif et neurogénique des cellules de Müller sont également stimulés par des voies de signalisation bien connues comme la voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Das et al. 2006; Osakada et al. 2007; Del Debbio et al. 2010; Liu et al. 2013; Yao et al. 2016; Angbohang et al. 2016) et la voie Sonic Hedgehog (SHH) (Wan et al. 2007; Gu et al. 2017). Il a par exemple été récemment montré que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine suffit à déclencher la prolifération des cellules de Müller en absence de lésion. Dans ce contexte, l'action de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine passe par l'activation de la transcription du gène de reprogrammation *Lin-28* (Yao et al. 2016). Une étude récente a montré que l'activation de la voie SHH grâce à l'utilisation de purmorphamine, un agoniste de la voie, stimule la prolifération et la dédifférenciation des cellules de Müller *in vitro* chez le rat (Gu et al. 2017). L'activation de la voie SHH dans ce contexte conduit à une augmentation de l'expression de la Cycline





D1 et de la Cycline D3 des protéines régulant la réentrée dans le cycle cellulaire ainsi que l'expression de marqueurs de progéniteurs comme PAX6 (Gu et al. 2017).

La voie de signalisation Notch est également impliquée dans la régulation de la réponse des cellules de Müller (Das et al. 2006; Del Debbio et al. 2010; Del Debbio et al. 2016). Il semble que, en fonction de la phase du processus dans laquelle se trouvent les cellules de Müller, elle ait un effet positif ou négatif sur leur potentiel régénératif. En effet, la voie Notch stimule l'activation et la réentrée dans le cycle cellulaire des cellules de Müller en inhibant l'inhibiteur des kinases cycline-dépendantes p27kip1 qui est fortement exprimé dans les cellules de Müller quiescentes (Del Debbio et al. 2016). En revanche, il semble que la voie Notch inhibe la dédifférenciation et la neurogénèse des cellules de Müller (Jian et al. 2015). Il est possible que la voie Notch ait pour but de garder un pool de cellules de Müller dans la rétine lésée en empêchant la dédifférenciation de l'ensemble des cellules.

Il semble en fait que la réponse proliférative et neurogénique des cellules de Müller soit limitée chez les mammifères par différents mécanismes inhibiteurs et par un manque de facteurs pro-mitotiques et pro-neurogéniques. L'identification de ces facteurs moléculaires limitant le potentiel neurogénique des cellules de Müller pourrait donner des indications sur la façon de débloquent leur capacité régénérative latente. Différentes études ont mis en évidence que p53 pourrait être un des facteurs limitant le potentiel des cellules de Müller pour la régénération (Ueki et al. 2012; J. J. Zhao et al. 2014; Nomura-Komoike et al. 2016). Par ailleurs, la voie de signalisation TGF $\beta$  est essentielle à l'établissement et au maintien de cellules de Müller quiescentes dans la rétine post-natale du rongeur (Close et al. 2005). Il est donc possible qu'elle soit également impliquée dans le maintien de la quiescence des cellules de Müller chez l'adulte en cas de dégénérescence. Une étude a montré qu'une inhibition modérée de la voie TGF $\beta$  ne suffit pas à modifier le comportement prolifératif des cellules de Müller dans un modèle de dégénérescence induite au NMDA (Kugler et al. 2015). L'activation de la voie TGF $\beta$  n'a pas été testée *in vivo*, en revanche, *in vitro* il semble qu'elle empêche la différenciation neuronale induite par l'insuline dans une culture de cellules de Müller humaines. L'inhibition de la différenciation par la voie TGF $\beta$  implique l'inhibition de la voie Wnt (Angbohang et al. 2016). Comme mentionnée précédemment, la voie de signalisation BMP/Smad est activée dans les cellules de Müller en réponse à une lésion et stimule leur prolifération. Cependant, au regard des fonctions de BMP dans la gliogenèse, il n'est pas à exclure que la voie BMP puisse limiter le potentiel neurogénique des cellules de Müller activées (Ueki & Reh 2013). Enfin, un autre mécanisme limitant le potentiel neurogénique des cellules de Müller a récemment été mis en évidence. Il s'agit du complexe REST pour RE1-silencing transcription factor en anglais. Ce complexe est connu pour réprimer l'expression des gènes neuronaux dans les cellules non-neuronaux (Nesti et al. 2014). Il a été montré que son inhibition par des miRNA

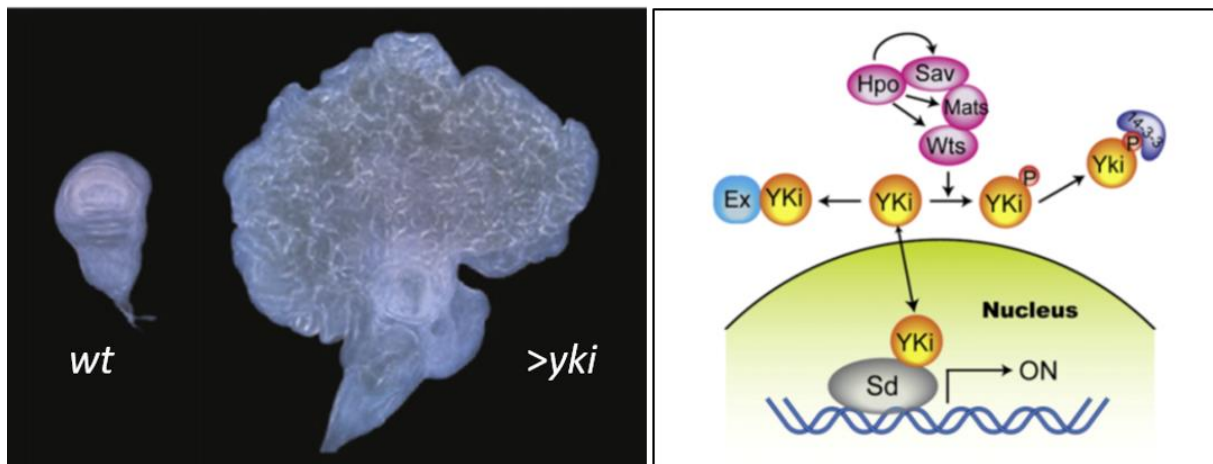


spécifiques permet de promouvoir la reprogrammation et la différenciation neuronale de cellules de Müller *in vitro* (Wohl & Reh 2016).

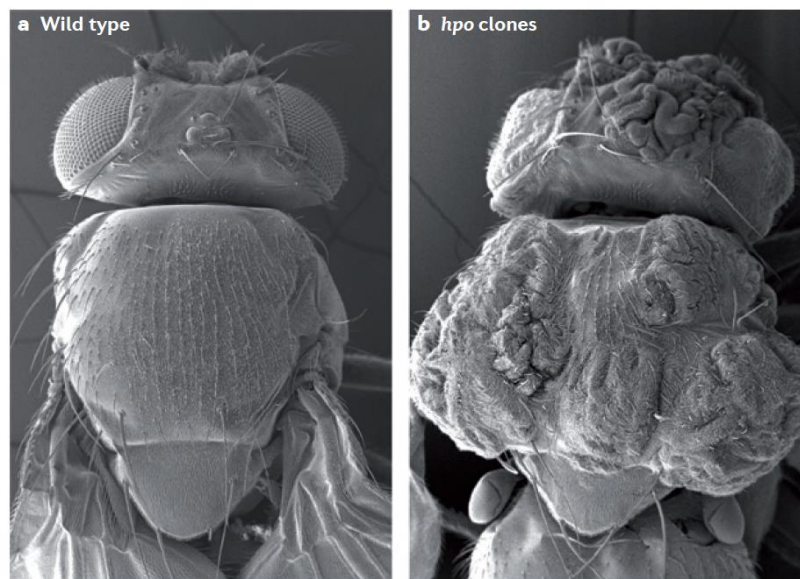
### 3. Conclusion

En conclusion, ces dernières années, de nombreux facteurs et réseaux de signalisation ont été mis en évidence comme étant impliqués dans l'activation, la dédifférenciation et la prolifération des cellules de Müller en cas de lésion chez différentes espèces de vertébrés. Cependant, la réponse des cellules de Müller étant tellement complexe, l'ensemble des mécanismes moléculaires et leurs interactions restent mal connus. Il est nécessaire de poursuivre les investigations dans ce sens afin de comprendre quels sont les facteurs limitant la régénération chez les mammifères en comparaison aux autres espèces comme le poisson et espérer pouvoir baser des stratégies thérapeutiques sur l'utilisation du potentiel régénératif endogène de la rétine de l'homme.

Dans ce contexte, au laboratoire nous nous sommes intéressés aux co-facteurs de transcription YAP et TAZ. Ces protéines qui sont connues pour être les effecteurs de la voie de signalisation Hippo sont impliquées dans la régulation des cellules souches et dans la régénération de plusieurs tissus chez les mammifères. Cependant, très peu de choses sont connues sur leur rôle dans la rétine et encore moins sur leur potentielle implication dans la régénération rétinienne.



**Figure 22: 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 2010). (A droite) Schéma simplifié du cœur de la voie de signalisation Hippo chez la drosophile. Adapté de (Zhao, Lei, & Guan, 2009).



**Figure 23: Phénotype mutant *hpo* chez la drosophile.** (a,b) Photographies par microscopie électronique (a) d'une mouche sauvage et (b) d'une mouche, avec des clones de cellules mutantes homozygotes pour *hpo*, qui présente un phénotype d'excès de croissance du cuticule. D'après (Halder et al. 2011).

# III. LES CO-FACTEURS DE TRANSCRIPTION YAP ET TAZ

## 1. La voie de signalisation Hippo

### 1.1.1 Découverte de la voie Hippo chez la drosophile

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 » responsables de la régulation de la croissance sans modification du « patterning » des organes. Le premier gène ainsi identifié est le gène *Wts* qui code pour la kinase **WTS** de la famille NDR (Nuclear Dbf2-Related) (Justice et al. 1995; Xu et al. 1995). Les cellules portant des mutations de *Wts* présentent des phénotypes tumoraux puisqu'elles prolifèrent trop et n'entrent pas en apoptose. D'autres cribles ont par la suite révélé que la délétion de trois autres gènes, *Hippo* (*hpo*), *Salvador* (*sav*) et *Mats* (*mats*) conduit au même phénotype (Harvey et al. 2003; Pantalacci et al. 2003; Udan et al. 2003; Wu et al. 2003; Jia et al. 2003; Tapon et al. 2002; Lai et al. 2005). La protéine **HPO** est une kinase appartenant à la famille des Sterile 20-like kinases. Elle phosphoryle et active WTS. Les protéines codées par *sav* et *mats* interagissent avec HPO et WTS respectivement pour faciliter l'activation de WTS. Ainsi, ces quatre protéines forment une cascade de kinases qui restreint la croissance et la prolifération cellulaire. Cette cascade de signalisation a pour cible, en aval, la protéine **YKI** (Yorkie) (Huang et al. 2005). Il a en effet été montré que WTS phosphoryle et inactive directement YKI (Huang et al. 2005; Dong et al. 2007). Ainsi, 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, qui est un co-activateur transcriptionnel. Ainsi, la surexpression de *Yki* phénocopie la perte de fonction des différents composants de la cascade de kinases (Figure 22) (Zhao et al. 2009; Pan 2010; F. X. Yu et al. 2015).

Cette voie de signalisation ainsi découverte était au début nommée voie Warts ou voie Salvador-Warts-Hippo. Elle est désormais appelée simplement voie Hippo. 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, illustre bien l'ensemble des phénotypes d'excès de croissance obtenus après une perte de fonction de ces différents composants (Figure 23).

Table 1. Hippo Pathway Components and Major Functions		
Drosophila	Mammals	Major Functions in Hippo Pathway
Hippo (Hpo)	MST1/2	Phosphorylates LATS1/2, MOB1, and SAV1, leading to LATS1/2 activation
Salvador (Sav)	SAV1	Interacts with MST1/2, promotes phosphorylation of LATS1/2 by MST1/2
Warts (Wts)	LATS1/2	Phosphorylates and inactivates YAP/TAZ
Mats	MOB1A/B	Scaffold protein of LATS1/2
Yorkie (Yki)	YAP/TAZ	Transcription co-activator, major effector of the Hippo pathway
Scalloped (Sd)	TEAD1-4	Transcription factors that mediate the effect of YAP/TAZ
Tgi	VGLL4	Competes with YAP/TAZ for TEADs, inhibits YAP/TAZ functions
misshapen (Msn)	MAP4K4/6/7	Phosphorylates and activates LATS1/2
Merlin (Mer)	Merlin/NF2	May form a complex and mediates upstream signals (from plasma membrane) to MST1/2; NF2 may bring LATS1/2 to plasma membrane and facilitate its activation by MST1/2
Kibra	KIBRA	
Expanded (Ex)	FRMD6?	
	AMOT	Sequesters YAP/TAZ to cell junctions, binding and indirectly activating LATS1/2; a substrate of LATS1/2

Figure 24: Composants de la voie Hippo et leurs principales fonctions. D'après (Yu et al. 2015).

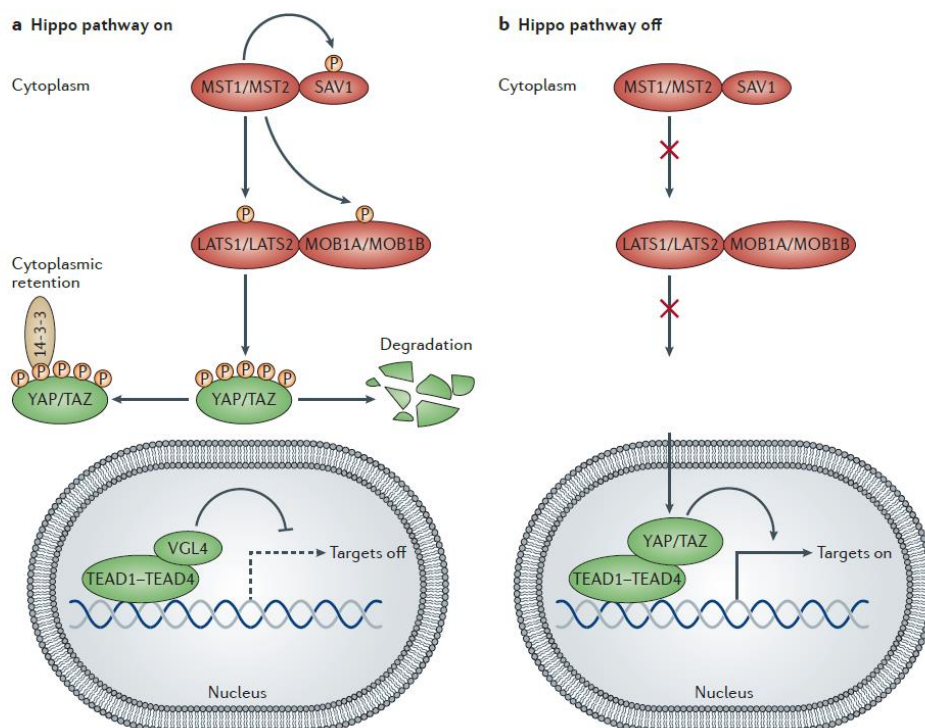


Figure 25: Inhibition des co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ par LATS1/2. (A gauche) Quand la voie Hippo est ON, YAP/TAZ sont phosphorylés par LATS1/2 sur plusieurs sites ce qui entraîne son interaction avec 14-3-3 et sa rétention cytoplasmique. Sa phosphorylation conduit également à l'ubiquitinylation de YAP/TAZ et sa dégradation. VGLL4 interagit avec TEAD et réprime la transcription des gènes cibles. (A droite) Quand la voie Hippo est OFF, YAP/TAZ entre dans le noyau, interagit avec TEAD et induit la transcription des gènes cibles. D'après (Johnson & Halder 2014).

### 1.1.2 La voie Hippo chez les mammifères

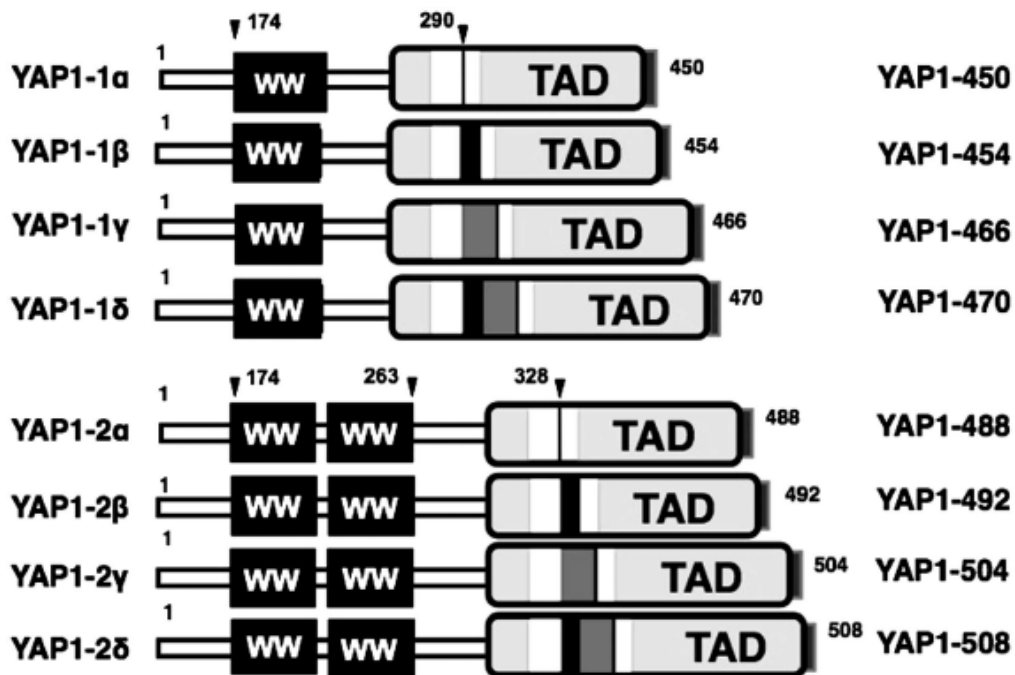
De nombreuses études ont démontré expérimentalement la conservation de la structure de la voie de signalisation Hippo ainsi que son rôle dans la régulation de la taille des organes chez les mammifères. En revanche, ces études ont également révélé une complexité plus importante. En effet, la plupart des composants de la voie découverte chez la drosophile possèdent plusieurs homologues chez les mammifères. Il existe deux homologues d'Hpo, **MST1** et **MST2** (Mammalian Sterile 20-like kinase) et deux homologues de Wts, **LATS1** et **LATS2** (Large Tumor Suppressor) (Figure 24). 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) (aussi appelé WWTR1) (Dong et al. 2007; Lei et al. 2008). Ainsi, les kinases MST, associées à la protéine **SAV1** (l'homologue de Salvador aussi appelé WW45) phosphorylent et activent les kinases LATS associées aux co-facteurs **MOB1A** et **MOB1B** (Wu et al. 2003; Callus et al. 2006; Praskova et al. 2008; Chan et al. 2005). Cette étape aboutit à la phosphorylation de YAP et TAZ et à l'inhibition de leurs activités nucléaires. En effet, quand elles sont phosphorylées, les protéines YAP et TAZ sont séquestrées dans le cytoplasme ou dégradées (Figure 25). Pour résumé, quand la voie Hippo est activée, YAP et TAZ sont phosphorylés et donc séquestrés dans le cytoplasme et dégradés alors que, quand la voie Hippo est inactive, YAP et TAZ transloquent au noyau pour interagir avec des facteurs de transcription et activer la transcription de leur gènes cibles (Figure 25).

En plus de la cascade de kinases qui est le cœur de la voie Hippo, d'autres protéines sont parfois considérées comme faisant partie de la voie Hippo. Il s'agit de NF2 (Neurofibromin 2 ; aussi appelée MERLIN), FRMD6 (FeRM Domain containing 1/6) et KIBRA (ou WW domain-Containing protein 1/2) (Kodaka & Hata 2015). Ces protéines activent la cascade de kinases et régulent donc négativement YAP/TAZ.

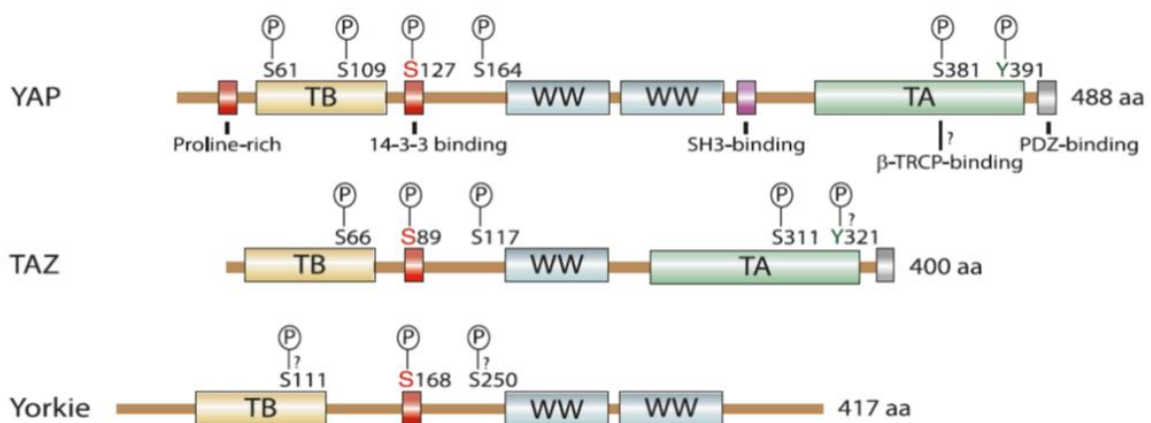
## 2. Structure de YAP et TAZ

Officiellement, l'effecteur de la voie Hippo est appelé YAP1 mais comme cela porte à confusion, laissant penser qu'il s'agit d'une famille multigénique, il est de plus en plus souvent nommé simplement YAP. Il s'agit d'un co-facteur de transcription de 65 kDa codée par le gène *Yap1* aussi appelé *Yap*. Sa particularité majeure est de posséder un ou deux domaines WW en fonction des isoformes. Le domaine WW, caractéristique de la voie de signalisation Hippo, est un domaine d'interaction protéique contenant deux résidus tryptophane séparés par une vingtaine d'acides aminés (Sudol et al. 1995). Il existe huit isoformes de YAP chez l'homme ayant pour origine un épissage





**Figure 26: Représentation schématique des 4 isoformes de YAP1-1 et des 4 isoformes de YAP1-2.** 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 (Sudol 2013).



**Figure 27: Structure protéique des effecteurs YAP, TAZ et YKI.** Comparaison de l'organisation des domaines conservés des protéines YAP et TAZ humaines et de 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).

alternatif au niveau des exons localisés dans le domaine d'activation de la transcription de YAP. Ces isoformes sont classées en deux groupes : YAP1-1 (ou YAP1) et YAP1-2 (ou YAP2) (Figure 26) (Sudol et al. 1995; Gaffney et al. 2012; Sudol 2013). Les protéines YAP1-1 possèdent un seul domaine WW alors que les YAP1-2 en ont deux. La plupart du temps, dans la littérature, la nomenclature YAP fait référence aux protéines YAP1-2, majoritaires chez la souris et l'humain (Komuro et al. 2003). Leurs fonctions respectives ne sont pas connues. En revanche, il semble que YAP1-2 soit un co-activateur de transcription plus puissant que YAP1-1 (Komuro et al. 2003). Le deuxième effecteur de la voie Hippo, TAZ, également nommé WWTR1, est une protéine de 44 kDa codée par le gène, *wwtr1*. TAZ, paralogue de YAP, contient un seul domaine WW (Webb et al. 2011). Alors que la protéine YAP est conservée de la drosophile à 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 (Figure 27) (Huang et al. 2005; K. Wang et al. 2009). Le domaine 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. 2003; Zaidi et al. 2004; Hong et al. 2005) ou encore p73 (Strano et al. 2001). En plus de ce domaine WW, la région N-terminale de YAP et TAZ contient un domaine de liaison aux protéines 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; Huang et al. 2005). Bien que ces deux domaines soient conservés entre YAP et TAZ, le domaine de liaison aux protéines TEAD de TAZ n'est pas exactement identique à celui de YAP et il existe des différences dans la fixation des facteurs TEADs (Hau et al. 2013; Kaan et al. 2017). Par ailleurs, YAP possède un domaine riche en résidus proline et un motif de liaison SH3, absents chez 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 dans les interactions entre YAP et d'autres protéines incluant les kinases YES et SRC (Sudol 1994). Enfin, dans leur région C-terminale, YAP et TAZ possèdent un important domaine de transactivation ainsi qu'un motif de liaison aux domaines PDZ (Sudol et al. 1995; Yagi et al. 1999; Kanai et al. 2000). Ce dernier est essentiel pour la translocation nucléaire de YAP/TAZ et leur activité transcriptionnelle (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 des différences importantes qui montrent à l'inverse que ces deux protéines possèdent aussi des fonctions bien distinctes. Une des évidences les plus remarquables des différences de fonctions entre ces deux effecteurs est que les « knock-out » de *Yap* et *Taz* conduisent à des phénotypes différents chez la souris. Le « knock-out » de

Modification	Regulatory enzyme	Functional consequence
YAP		
S61-p	LATS1/2	Cytoplasmic retention?
S109-p	LATS1/2	Cytoplasmic retention?
T119-p	CDK1	Cell cycle regulation
S127-p	LATS1/2	14-3-3 binding/cytoplasmic retention
S164-p	LATS1/2	Cytoplasmic retention?
S289-p	CDK1	Cell cycle regulation
S367-p	CDK1	Cell cycle regulation
S397-p	LATS1/2	Primer for S400/403-p
S400-p	CK1 $\epsilon/\delta$	Degradation/ $\beta$ -TrCP recruitment
S403-p	CK1 $\epsilon/\delta$	Degradation/ $\beta$ -TrCP recruitment
Y407-p	ABL/SRC/YES	Altered nuclear activity
K494-meth	SET-7	Cytoplasmic retention
TAZ		
S58-p	GSK3 $\beta$	Degradation
S62-p	GSK3 $\beta$	Degradation
S66-p	LATS1/2	Cytoplasmic retention?
S89-p	LATS1/2	14-3-3 binding/cytoplasmic retention
S117-p	LATS1/2	Cytoplasmic retention?
S311-p	LATS1/2	Primer for S314-p
S314-p	NEK1/CK1 $\epsilon/\delta$	Degradation/ $\beta$ -TrCP recruitment
Y321-p	ABL	Altered nuclear activity

Figure 28: Modifications post-traductionnelles contrôlant l'activité de YAP/TAZ. D'après (Varelas 2014).

*Yap* cause une létalité embryonnaire précoce alors que les souris « knock-out » pour *Taz* sont viables mais présentent des dysfonctionnement rénaux (Morin-Kensicki et al. 2006; Makita et al. 2008; Hossain et al. 2007; Tian et al. 2007).

### 3. Régulation de YAP/TAZ

La dérégulation de YAP/TAZ conduisant à des perturbations importantes, il est évident que la régulation de l'activité de ces deux effecteurs de la voie Hippo est cruciale pour l'homéostasie cellulaire et tissulaire chez les mammifères. La régulation de YAP/TAZ est en grande partie basée sur la régulation de sa localisation subcellulaire son activité transcriptionnelle nécessitant une localisation nucléaire. Il faut tout de même noter que les choses sont plus complexes car YAP/TAZ possède également des fonctions dans le cytoplasme. La régulation de la localisation et de l'activité de YAP/TAZ consiste principalement en des modifications post-traductionnelles des deux protéines. Cette régulation peut passer par la cascade de kinases de la voie Hippo qui est définie comme étant la voie Hippo canonique mais peut également s'effectuer indépendamment des kinases MST1/2 et LATS1/2. Il s'agit dans ce cas de la voie Hippo non-canonique. Par ailleurs, peu de choses sont connues sur la régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes *Yap* et *Taz*.

#### 3.1. Modifications post-traductionnelles de YAP/TAZ

La phosphorylation par les kinases LATS1/2 est le mécanisme de régulation négative de YAP/TAZ le plus important et le mieux connu. Les protéines YAP et TAZ possèdent respectivement cinq et quatre sites de phosphorylation par LATS1/2. Il s'agit de résidus sérine (S) situés dans les séquences consensus HXRXXS. Les résidus sérine 127 de YAP (S127) et 89 de TAZ (S89) sont les sites les plus importants chez la souris (Huang et al. 2005; Kanai et al. 2000; Lei et al. 2008; Basu et al. 2003). La phosphorylation de ces sites entraîne la formation de sites de fixation de la protéine 14-3-3, la séquestration de YAP/TAZ dans le cytoplasme et donc l'inhibition de leur activité transcriptionnelle (Figure 28) (Zhao et al. 2007; Hao et al. 2008; Varelas 2014). Une étude a en effet montré que la mutation de S127 en alanine ou sa déphosphorylation par une phosphatase permettent d'augmenter la localisation nucléaire de YAP et son activité transcriptionnelle (P. Wang et al. 2011). Par ailleurs, la phosphorylation des résidus S381 de YAP et S311 de TAZ par LATS1/2 conduit à leur dégradation par le protéasome. Cette dégradation fait intervenir d'autres kinases comme la kinase CK1 $\delta/\epsilon$  (Casein Kinase 1) qui permettent le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 SCF/ $\beta$ -TRCP (Skp1, Cdc53, F-box proteins and  $\beta$ -Transducin Repeat-Containing Protein) (Zhao et al. 2010; Liu et al. 2010). Enfin, il a également été montré que LATS1/2 peut phosphoryler TAZ sur son résidu S66 ce qui entraîne la phosphorylation des S58 et S62 par la kinase GSK3 $\beta$  et par la suite son ubiquitination et sa dégradation (Huang et al. 2012).

Category	Name	Effect on YAP1 and/or TAZ	Brief description
Cell adhesion molecule	Fat4	Down	Protocadherin
	DCHS1	Down	Protocadherin
	CD44	Up	Hyaluronan receptor
Receptor	Gs-coupled receptor	Down	Mediated by PKA and Rho
	G12/13-, Gq/11-, Gi/o-coupled receptor	Up	Mediated by Rho
Membrane-associated protein, cell junction protein	LIF receptor	Down	Mediated by Scribble
	Merlin/NF2	Down	Interacts with $\alpha$ -catenin and Par3
	FRMD6/Willin	Down	Putative homolog of Drosophila expanded
	KIBRA	Down	Interacts with Merlin, AMOT, PTPN14, and LATS kinases
	AMOT (AMOT-p80, AMOT-p130, AMOTL1, AMOTL2)	Down or up	Interacts with Patj, Merlin, and Rich AMOT-p130, AMOTL1, and AMOTL2 interact with YAP1 and TAZ
	Ajuba (Ajuba, LIMD1, WTIP)	Down or up	All three interact with LATS kinases. LIMD1 reduces YAP1 phosphorylation in MDCK cells, while Ajuba increases it in mesothelioma cells
	ZO-2	Down (TAZ) or up (YAP1)	Interacts with YAP1 and TAZ and promotes nuclear localization
Actin cytoskeleton	PTPN14	Down	Interacts with YAP1
	$\alpha$ -Catenin	Down	Blocks dephosphorylation of YAP1
	High mechanical stress	Up	Rho and CDC42 activation
Cross-talk with other signaling pathway	Low mechanical stress	Down	F-actin capping/severing proteins
	Wnt pathway	Up	Phosphorylated $\beta$ -catenin promotes TAZ degradation Wnt signaling increases PPIA-dependent dephosphorylation of TAZ $\beta$ -Catenin mutant stabilizes YAP1
Others	Sonic hedgehog pathway	Up	Sonic hedgehog increases nuclear YAP1 via IRS
	LKB1	Down	Mediated by Scribble, MARK, and LATS2
	ILK	Up	Inhibits Merlin via MYPT1-PP1
	PP2A	Up	Dephosphorylates YAP1
	TAO-1	Down	Activates MST2
	SIK	Up	Phosphorylates WW45
	RASSF	Down	RASSF1A, RASSF2, and RASSF5 function as upstream regulators of the Hippo pathway. RASSF6 works as a tumor suppressor in parallel to the Hippo pathway. RASSF4 may have a similar mode of function
	NPHP4	Up (TAZ)	Inhibits the interaction between LATS1 and TAZ
	NPHP9	Up (TAZ)	Translocates TAZ into the nucleus
	ASPP1	Up (YAP1)	Blocks the interaction between YAP1 and LATS1
	ASPP2	Up (TAZ)	Promotes the interaction between TAZ and PPIA
	ANKHD1	Up (YAP1)	Forms a complex with YAP1 and is necessary for YAP1 full activity
	PML	Up (YAP1)	Stabilizes YAP1 by sumoylation and enhances p73-dependent transcription
WRN	Down (YAP1)	Suppresses YAP1 expression	

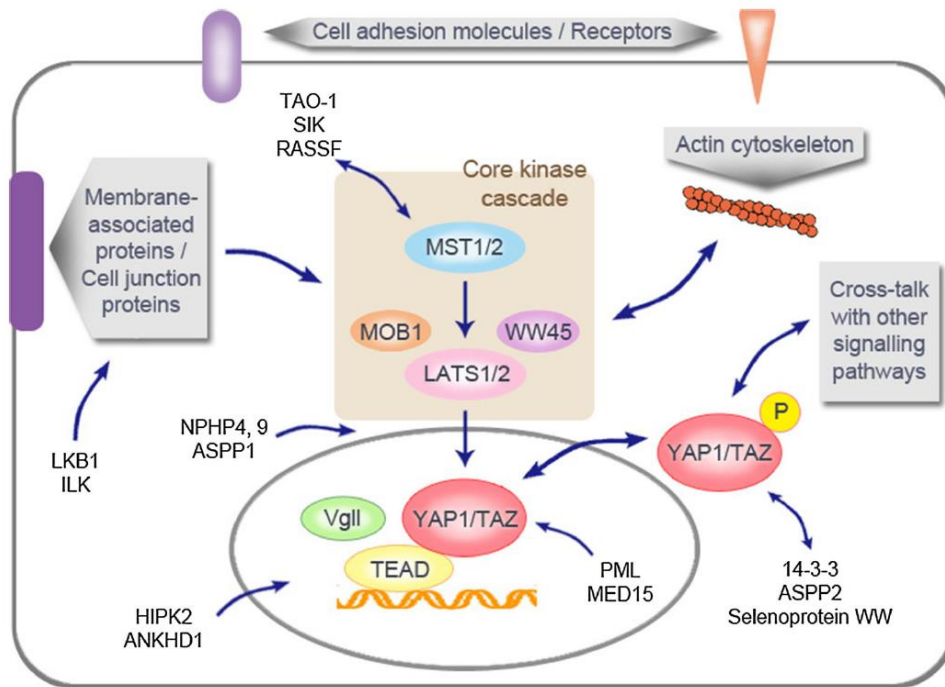
**Figure 29: Régulateurs directs et indirects de YAP et TAZ.** D'après (Kodaka & Hata 2015).

D'autres modifications post-traductionnelles de YAP/TAZ interviennent en dehors de la voie canonique Hippo. En effet, de nombreuses autres kinases phosphorylant YAP et TAZ ont été identifiées. Ces kinases comprennent YES, SRC, AKT, C-ABL, JNK, P38, CDK1 ou encore NEK1 (Kodaka & Hata 2015). Comme LATS1/2, AKT inhibe l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ en le phosphorylant et entraînant sa rétention dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 (Basu et al. 2003). D'autres kinases, au contraire, stimule l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ. Il a été montré par exemple que c-Abl phosphoryle YAP sur la tyrosine Y357 ce qui permet la stabilisation de YAP, promeut son interaction avec le facteur de transcription p73 et induit ainsi l'expression de gènes cibles pro-apoptotiques. Ce mécanisme semble impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN (Levy et al. 2008). De la même façon, il a été montré, dans des cellules cancéreuses, que la phosphorylation de YAP par la kinase YES favorise sa translocation au noyau et son interaction avec les facteurs  $\beta$ -caténine et TBX5 (T-box transcription factor 5) conduisant à l'expression de gènes anti-apoptotiques cette fois (Rosenbluh et al. 2012).

D'autres modifications que la phosphorylation sont impliquées dans la régulation de YAP/TAZ mais encore mal connues. YAP est par exemple méthylé sur sa lysine 494 par la méthyltransférase SET-7 (SET-domain containing lysine methyltransferase). Il a été montré que cette méthylation conduit à la séquestration cytoplasmique de YAP mais les signaux activant SET-7 en amont et le mécanisme de rétention cytoplasmique ne sont pas connus (Oudhoff et al. 2013). Une étude *in vitro* suggère que l'acétylation et la désacétylation de YAP nucléaire pourrait également être un mécanisme impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de YAP en réponse à des dommages de l'ADN (Hata et al. 2012). Enfin, YAP peut être modifié par sumoylation dans des cellules en culture en réponse aux dommages de l'ADN. Dans cette étude, les auteurs ont en effet montré que la protéine PML (ProMyelocytic Leukemia protein) stabilise YAP en empêchant son ubiquitination et induit sa sumoylation (Lapi et al. 2008).

### 3.2. Régulateurs de YAP/TAZ

De nombreux régulateurs de l'activité de YAP/TAZ ont été identifiés. Beaucoup de ces régulateurs agissent via la voie Hippo canonique c'est-à-dire via MST1/2 et LATS1/2 mais d'autres interagissent directement avec YAP/TAZ. J'ai décidé de ne pas détailler l'ensemble des régulations connues de l'activité de YAP/TAZ. Les principales protéines ayant été identifiées comme régulant l'activité de YAP/TAZ sont présentées dans la [Figure 29](#). Les principaux régulateurs de YAP/TAZ peuvent être classés en quatre catégories: (1) les molécules de l'adhésion cellulaire, (2) les récepteurs membranaires, (3) les protéines associées à la membrane et aux jonctions cellulaires et enfin, (4) les protéines du cytosquelette d'actine ([Figure 30](#)) (Kodaka & Hata 2015).



**Figure 30: Régulation de YAP et TAZ.** Régulation de YAP et TAZ. La cascade de kinases comprenant MST1/2, WW45, MOB1 et LATS1/2 régule négativement YAP/TAZ par phosphorylation. Dans le noyau YAP/TAZ interagit avec différents facteurs de transcription. TEAD interagit avec Vgll. YAP et TAZ sont régulés par : (1) des protéines associées à la membrane et des protéines associées aux jonctions cellulaires, (2) des protéines de l'adhésion cellulaire et des récepteurs, (3) le cytosquelette d'actine et (4) des interactions avec d'autres voies de signalisation. LKB1 affecte la localisation de Scribble. ILK inactive Merlin. TAO-1, SIK et RASSF régulent l'activité de MST1/2. NPHP4, NPHP9 et ASPP1 interagissent directement avec TAZ ou YAP. HIPK2 et ANKHD1 modulent la transcription médiée par YAP. YAP et TAZ cytoplasmiques interagissent avec 14-3-3 et plusieurs autres protéines. YAP et TAZ nucléaires interagissent avec plusieurs protéines, y compris PML et MED15 ainsi que des facteurs de transcription. D'après (Kodaka & Hata 2015).

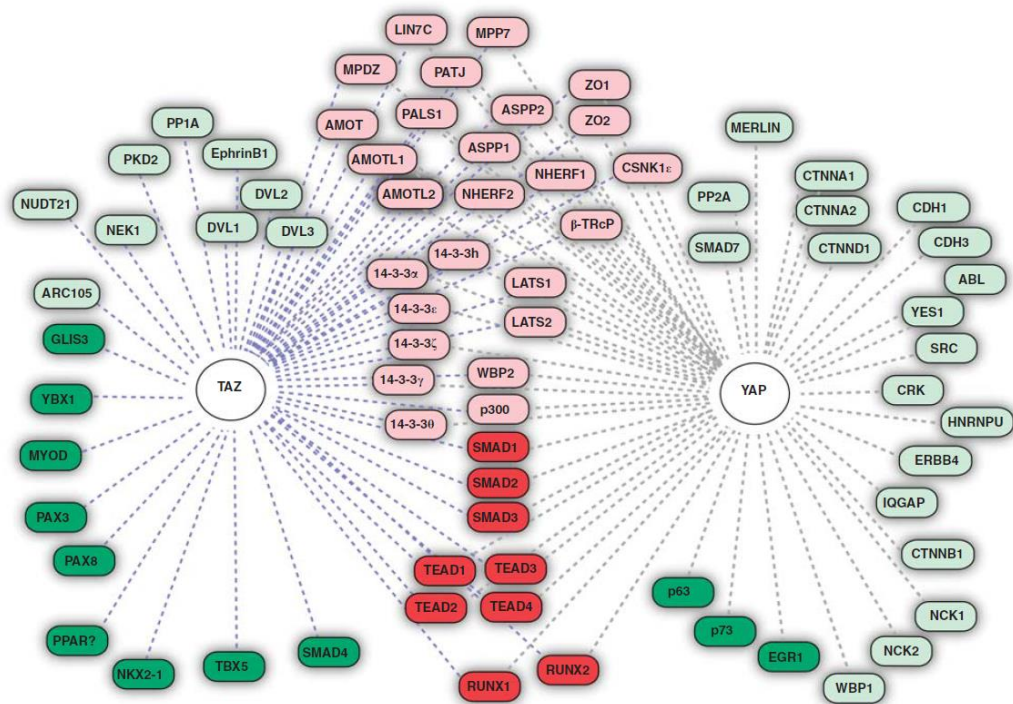
## 4. Partenaires et gènes cibles de YAP/TAZ

### 4.1. Partenaires de YAP/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 de leurs gènes cibles. Les facteurs de transcription 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; Zhang et al. 2009; Wu et al. 2008). Chez la drosophile il n'existe qu'un seul membre de la famille TEAD, appelé *Scaloped* tandis qu'il en existe quatre chez les mammifères (TEAD1-4). Le domaine N-terminal des TEADs contient un domaine TEA, capable de reconnaître des séquences d'ADN consensus situées dans la région promotrice des gènes cibles (Anbanandam et al. 2006). La partie C-terminale des protéines TEADs est impliquée dans l'interaction avec les co-activateurs YAP et TAZ et 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. De façon générale, l'inhibition de TEAD ou l'inhibition de l'interaction YAP-TEAD diminue fortement la transcription des gènes cibles de YAP et les effets sur la prolifération induit par une surexpression de YAP (Zhao et al. 2008). La sérine 94 de la protéine YAP de souris a été montrée comme essentielle pour l'interaction YAP-TEAD et la mutation de ce résidu diminue l'ensemble des effets induits par YAP. Les facteurs TEAD sont également des partenaires majeurs de TAZ, essentiels à son activité et à sa localisation nucléaire (Chan et al. 2009; Zhang et al. 2009). Récemment, un mécanisme de compétition pour la fixation à TEAD a été mis en évidence. YAP et TAZ sont en compétition avec le co-facteur VGLL4 (Vestigial-like 4) pour la fixation à TEAD. VGLL4 peut ainsi être considéré comme un antagoniste de YAP/TAZ. Quand la voie Hippo est activée, YAP/TAZ est inhibé et VGLL4 interagit avec TEAD pour inhiber son activité transcriptionnelle (Zhang et al. 2014; Jiao et al. 2014).

Les protéines YAP et TAZ sont capables de lier beaucoup d'autres facteurs de transcription en fonction du contexte cellulaire et du tissu. YAP et TAZ interagissent avec des facteurs possédant un motif PPxY via leur domaine WW. Ainsi, il a par exemple été montré que YAP interagit avec SMAD1, RUNX1/2, ERBB4, KLF4, p73 ou encore Pitx2 (Yagi et al. 1999; Strano et al. 2001; Komuro et al. 2003; Omerovic et al. 2004; Alarcon et al. 2009; Zhi et al. 2012; Imajo et al. 2015; G. Tao et al. 2016). Le complexe SMAD1/YAP permet l'expression de gènes de pluripotences alors que p73/YAP stimule l'expression de gènes pro-apoptotiques. Des études ont montré que TAZ fixe les facteurs RUNX1/2, PPARy, PAX3, TBX5, TTF1 et KLF4 (Hong et al. 2005; Cui et al. 2003; Murakami et al. 2005; Park et al. 2004; Murakami et al. 2006). De plus, YAP/TAZ se lie aussi à d'autres facteurs indépendamment du domaine WW. TAZ se lie aux protéines SMAD2/3 grâce à son domaine « coiled-coil » (Varelas et al. 2008).





**Figure 31: Schéma illustrant les partenaires protéiques connus de YAP et TAZ.** Les protéines fixant YAP et TAZ sont illustrées en rouge clair et celles interagissant avec seulement YAP ou TAZ sont en vert clair. Les facteurs de transcription sont représentés en couleur foncée: rouge pour ceux qui sont exclusifs à YAP ou TAZ et vert pour ceux qui fixent YAP et TAZ). D'après (Mauviel et al. 2012).

Transcription factors	Target genes	Functions
TEADs	<i>CTGF</i> <i>Cyr61</i> <i>Axl</i> <i>CDK6</i> <i>Oct4/Nanog</i> <i>Cdx2</i> <i>Gata3</i> <i>BCL2/BIRC5</i> <i>c-Myc</i> <i>EDN1/2</i> <i>Pax3</i> <i>RHAMM</i> <i>SOX9</i> <i>ZEB2</i>	Cell proliferation, metastasis Cell proliferation Cell proliferation, metastasis Senescence Stemness Trophoblast differentiation Trophoblast differentiation Anti-apoptosis Cell proliferation, metastasis Cell proliferation, metastasis Embryogenesis Cell proliferation, metastasis Cancer stem cell maintain Barrier for lung cancer cell fate conversion
Smad1		Stemness
Smad2/3-TEADs	<i>Snail/Twist1/Slug/NEGR1/UCA1/CTGF</i>	Cell proliferation and EMT
p73/p63	<i>PML</i>	Cell apoptosis
KLF5	<i>FGF-BP/ITGB2</i>	Cell proliferation
Runx1/2		Osteoblast differentiation in MSCs
ErbB4		Cell proliferation
TBX5	<i>BCL2L1/BIRC5</i>	Anti-apoptosis and cardiac development
β-catenin	<i>Sox2/Snai2</i>	Cardiomyocyte proliferation
FoxO1		Antioxidant
Unknown	<i>AREG</i>	Cell proliferation, cell migration

**Figure 32: Gènes cibles de YAP/TAZ et facteurs de transcriptions partenaires.**

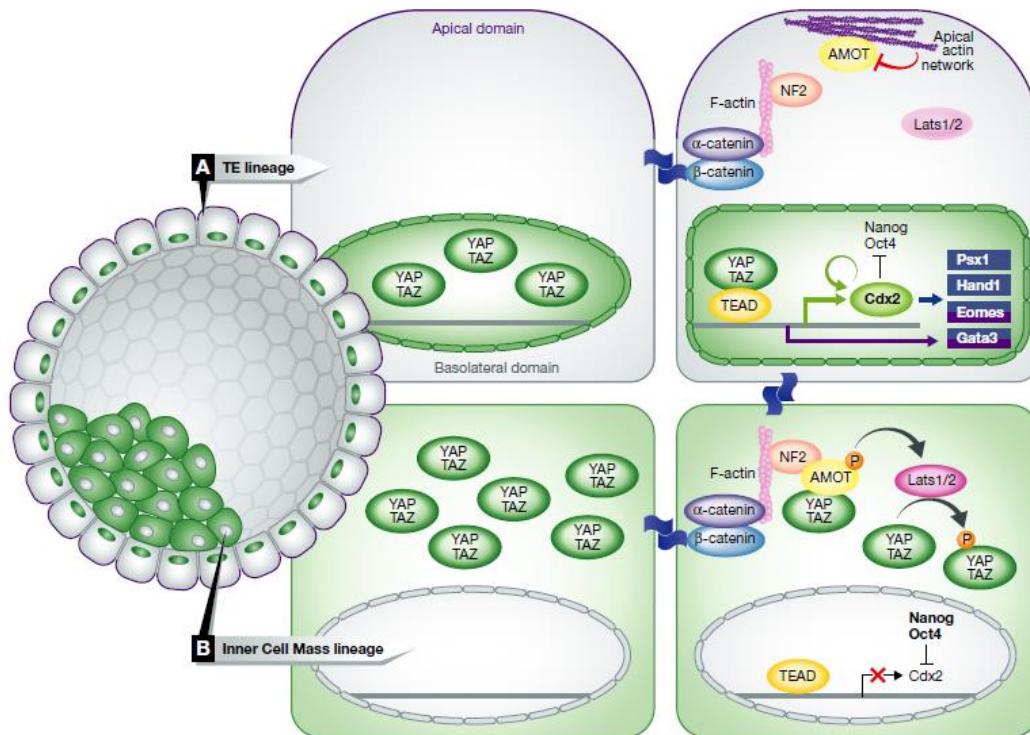
De manière très intéressante, YAP peut interagir avec la  $\beta$ -caténine et stimuler l'expression des gènes cibles de la voie canonique Wnt (Heallen et al. 2011). Il a également été montré que YAP interagit avec FOXO1 via son domaine de liaison à TEAD et son domaine de transactivation C-terminal pour activer la transcription de gènes antioxydants (Shao et al. 2014; Mao et al. 2015). Il est important de noter que bien que YAP et TAZ soient généralement co-activateurs, ils peuvent également être co-répresseur de transcription (M. Kim et al. 2015). Il a par exemple été montré que YAP peut se lier à RUNX2 pour inhiber la transcription de gènes pro-différenciation dans les cellules souches mésenchymateuses (Zaidi et al. 2004). Au laboratoire, mes collègues ont montré que YAP interagit avec PKNOX1 un facteur de transcription impliqué dans le maintien de la stabilité génomique (Cabochette et al. 2015).

Enfin, 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. Ces études ont permis de confirmer des interactions et d'identifier de nouveaux partenaires de YAP et TAZ (Figure 31) (Kohli et al. 2014; Mauviel et al. 2012).

## 4.2. Cibles transcriptionnelles de YAP/TAZ

Il est difficile de dresser une liste des gènes cibles de YAP/TAZ tant ils sont dépendants du tissu, du facteur de transcription auquel YAP/TAZ est associé et du contexte. Une partie des gènes cibles identifiés sont présentés dans le tableau de la Figure 32.

Il est également difficile de classer les différents gènes cibles de YAP/TAZ. De nombreux gènes cibles codent des protéines impliquées dans la croissance cellulaire, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Les deux gènes *Ctgf* (Connective Tissue Growth Factor) et *Cyr61* (CYstein-Rich angiogenic inducer 61 ou CCN1) sont les gènes cibles les plus connus et les plus utilisés pour rapporter l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ (Zhao et al. 2008; Vassilev et al. 2001; Zhang et al. 2011; C. Li et al. 2013). CTGF et CYR61 appartiennent à la même famille des CCN (*Cyr61*, *Ctgf*, *Nov*) qui sont 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. Par ailleurs, YAP/TAZ possède également des gènes cible codant pour des ligands d'autres voies de signalisation comme la voie Wnt, EGF, Hedgehog ou Notch. Il a par exemple été montré que YAP active l'expression de gènes codant pour des ligands de l'EGFR comme *Areg* (codant pour l'amphiréguline) et *Hbegf* (Zhang et al. 2009; He et al. 2015).



**Figure 33: La localisation dynamique de YAP/TAZ régule le développement pré-implantatoire chez la souris.** Au cours de l'étape de pré-implantation, les futures cellules du trophoctoderme (TE) forment 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).



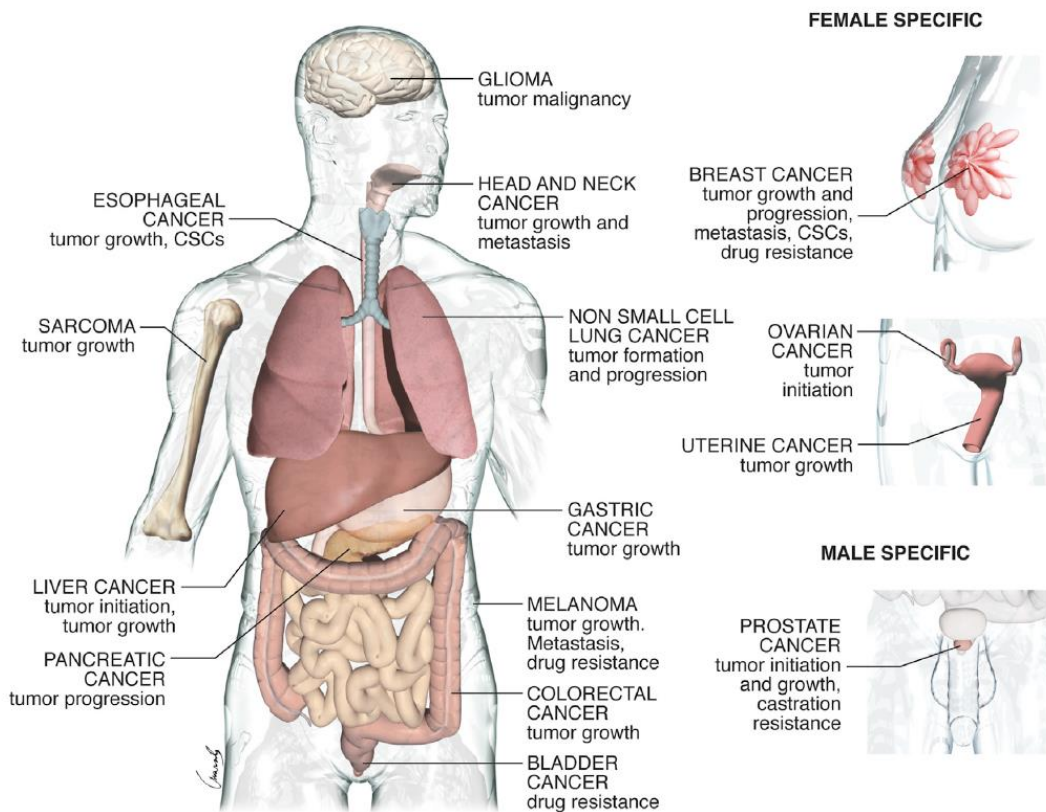
**Figure 34: Impact de la surexpression de *Yap* sur la croissance des organes.** Comparaison de la taille d'un foie d'une souris sauvage adulte (à gauche) par rapport à celui d'une souris du même âge (à droite) chez laquelle *Yap* a été surexprimé. D'après (Pan 2010).

## 5. Fonctions de YAP/TAZ

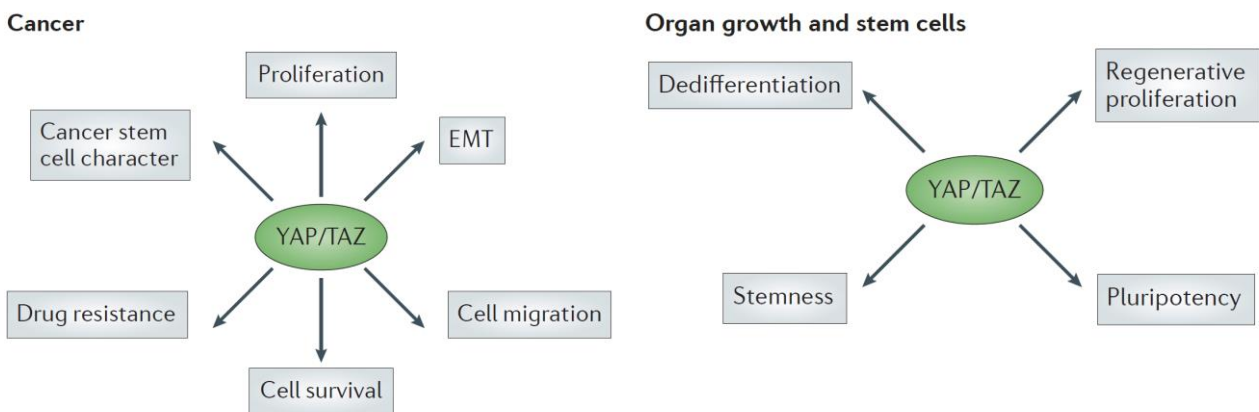
### 5.1. Au cours du développement

YAP et TAZ ont des fonctions essentielles au cours du développement. Ils 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). La perte 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). Des études ont montré que YAP et TAZ sont des acteurs clé de la spécification des cellules au cours du développement pré-implantatoire (Figure 33) (Nishioka et al. 2009; Hirate et al. 2013; Cockburn et al. 2013; Gumbiner & Kim 2014; Mo et al. 2014).

Au cours du développement embryonnaire plus tardif, l'activité nucléaire de YAP/TAZ est nécessaire pour la prolifération des cellules progénitrices mais doit être limitée pour maintenir l'homéostasie tissulaire. En effet, une activité excessive de YAP/TAZ, due à l'inactivation des kinases de la voie Hippo ou à la surexpression de *Yap* ou *Taz*, conduit à une croissance excessive des organes. Cette augmentation de la taille des organes est due à une inhibition de l'apoptose et à une augmentation de la prolifération qui aboutissent à une augmentation du nombre de cellules (Figure 34) (Dong et al. 2007; Camargo et al. 2007; Song et al. 2010; Heallen et al. 2011; Lu et al. 2010; D. Zhou et al. 2009). En plus d'impacter le nombre de cellules, la surexpression de *Yap* entraîne une dérégulation de la balance prolifération/différenciation des progéniteurs. Par exemple, la surexpression de *Yap* dans le foie chez la souris provoque une expansion massive du nombre de progéniteurs en prolifération aux dépens des cellules différenciées. 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 (Camargo et al. 2007). Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de YAP par inactivation de *Sav*, *Lats2* ou *Mst1/2* spécifiquement dans les tissus cardiaques entraîne une augmentation de la taille du cœur associée à une augmentation du nombre de cardiomyocytes en prolifération (Heallen et al. 2011) alors que la délétion de *Yap* durant le développement tardif du cœur est létal en raison d'une hypoplasie du myocarde (Xin et al. 2013; Del Re et al. 2013). Ainsi, les protéines YAP et TAZ sont impliquées à la fois dans le développement très précoce et plus tard au cours du développement embryonnaire.



**Figure 35: YAP/TAZ dans les tumeurs humaines.** Types de tumeurs pour lesquels les données épidémiologiques et fonctionnelles ont montré une activation de YAP/TAZ. D'après (Zanconato et al 2016).

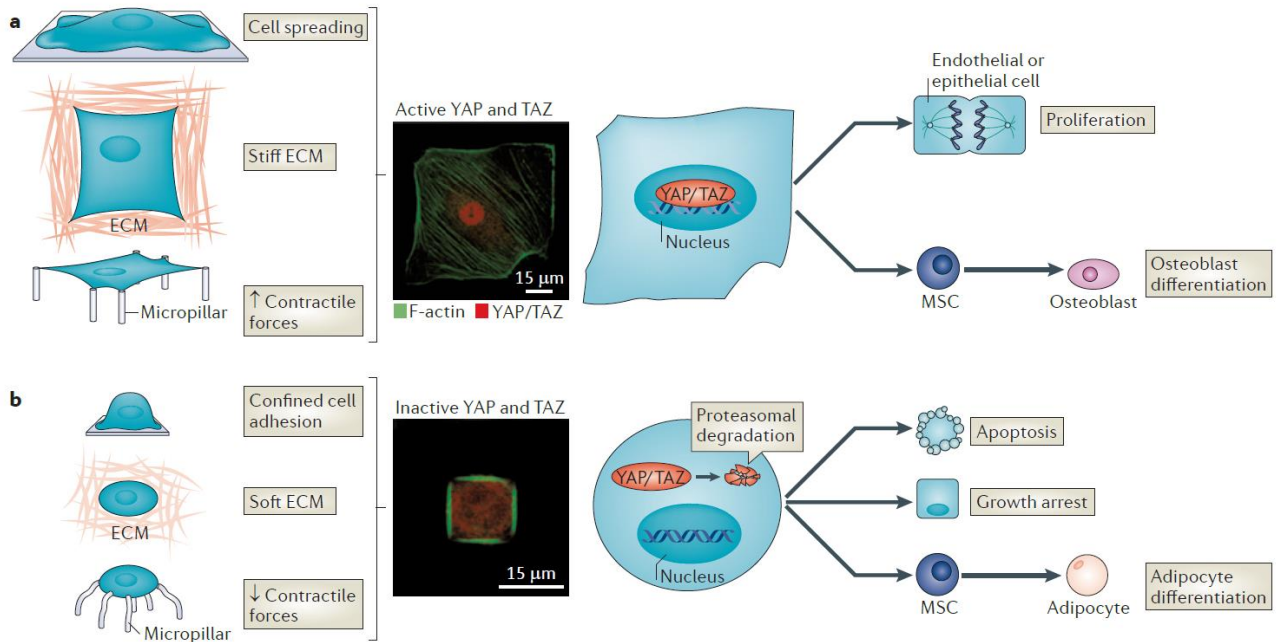


**Figure 36: YAP/TAZ contrôlent plusieurs propriétés cellulaires responsables du développement de cancers mais aussi nécessaires à l'activité des cellules souches.** Certaines de ces propriétés comme l'activation de la prolifération et le maintien des cellules souches sont à la fois importantes pour 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).

## 5.2. Dans la cancérogénèse

Comme exposé précédemment, les protéines YAP et TAZ contrôlent le nombre de cellules et la taille des organes via la régulation de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de l'amplification des progéniteurs. S'ils sont dérégulés, tous ces processus peuvent contribuer au développement de cancer. L'implication de YAP/TAZ dans la cancérogénèse a été explorée et de nombreuses études ont permis de montrer que YAP et TAZ sont des oncogènes alors que la voie Hippo qui les inhibent est une voie suppresseur de tumeur (Johnson & Halder 2014; Mo et al. 2014; Zhu et al. 2015; Zanconato et al. 2016). Chez l'homme, des mutations inactivant le gène *Nf2* sont responsables du développement de tumeurs du système nerveux central (Gutmann et al. 2001). Peu de mutations des autres composants de la cascade de signalisation Hippo ont été trouvées dans les cancers humain. La délétion du gène *Sav1* a été retrouvée dans deux lignées cancéreuses du rein et une mutation perte de fonction de *Mob1a* (codant un coactivateur de LATS1/2) a été identifiée dans des mélanomes humains (Tapon et al. 2002; Lai et al. 2005). Au-delà des mutations de l'ADN, des modifications épigénétiques sont impliquées dans l'inactivation de composants de la voie conduisant à la tumorigénèse. Une hyperméthylation du promoteur de *Mst1* ou *Lats1/2* a été retrouvée dans différents cancers y compris les cancers du sein (Seidel et al. 2007; Jiang et al. 2006; Takahashi et al. 2005). Les anomalies génétiques de *Yap* et *Taz* sont, elles, très courantes dans les cancers chez l'homme et tout particulièrement les amplifications. L'activation anormale de YAP/TAZ a été rapportée dans de nombreux cancers différents (Figure 35) (Fernandez-L et al. 2009; Dai et al. 2003; Snijders et al. 2005; Bashyam et al. 2005; Zender et al. 2006). De manière cohérente, un niveau protéique élevé et une localisation nucléaire anormale de YAP ont été observés dans de nombreuses tumeurs solides (Steinhardt et al. 2008).

L'activité oncogénique de YAP/TAZ a été étudiée chez la souris. De nombreuses études ont montré que comme chez l'homme, une activité importante de YAP/TAZ due à une délétion des kinases de la voie Hippo ou à la surexpression de *Yap* conduit au développement de tumeurs (Mao et al. 2015). Les différents modèles murins ainsi que de nombreuses lignées cellulaires sont utilisés pour étudier le mécanisme d'action de YAP/TAZ dans le développement tumoral. Je ne détaillerai pas ces études mais pour résumer, l'activité excessive de YAP/TAZ provoque une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire associée à une forte acquisition de propriétés caractéristiques des cellules tumorales comme la résistance aux traitements, la transition épithélio-mésenchymateuse et l'inhibition de la sénescence (Figure 36) (Johnson & Halder 2014). Enfin, il faut noter que ces dernières années, les études sont tout particulièrement centrées sur l'implication de YAP/TAZ dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements (Lin et al. 2015; Kim & Joon 2017).



**Figure 37: 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 et les cellules sont plutôt dirigées vers l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. D'après (Halder et al. 2012).

### 5.3. Dans la réponse aux stress

#### **Réponse aux stress mécaniques**

Les cellules ne perçoivent pas uniquement leur environnement via des signaux solubles, mais également via des signaux physiques et mécaniques comme l'élasticité de la matrice extracellulaire ou les forces exercées par les cellules voisines. Par un processus appelé « mechanotransduction », les cellules traduisent ces stimuli physiques en signaux biochimiques qui vont contrôler plusieurs aspects de comportement cellulaire comme la prolifération et la différenciation (Halder et al. 2012; Mo 2017). Des études *in vitro* ont mis en évidence que YAP et TAZ sont des senseurs et médiateurs de cette réponse cellulaire aux modifications de l'environnement physique qui peuvent être de réels stress pour les cellules (Dupont et al. 2011; Low et al. 2014). Il a été montré que la rigidité de la matrice extracellulaire contrôle à la fois la localisation subcellulaire de YAP/TAZ et leur expression. Il a en effet été observé que YAP et TAZ sont majoritairement cytoplasmiques dans les cellules cultivées sur une matrice souple alors que dans les cellules cultivées sur une matrice rigide, ils transloquent au noyau et activent la transcription de gènes associés à la prolifération. Cette réponse de YAP/TAZ à la modification de la matrice extracellulaire fait intervenir des Rho-GTPases et le cytosquelette d'actomyosine (Dupont et al. 2011; Halder et al. 2012; Wada et al. 2011; Zhao et al. 2012). Une étude utilisant des cultures primaires de cellules humaines du trabeculum a, quant à elle, montré que les modifications de l'élasticité du substrat de culture affectent l'expression de *Yap* et *Taz* dans le sens qu'une augmentation de la rigidité du substrat entraîne une augmentation de l'expression des deux gènes (Raghunathan et al. 2017; Thomasy et al. 2013). Par ailleurs, de manière intéressante, il semble que le remodelage de la matrice extracellulaire soit partiellement dépendant de YAP. En effet, l'activation de YAP dans des fibroblastes associés au cancer (cellules connues pour remodeler la matrice extra cellulaire dans les tumeurs), augmente la rigidité de la matrice en stimulant l'expression de gènes cibles associés à la matrice extracellulaire comme *Cyr61*, *Ctgf* ou *Areg* (Calvo et al. 2013). YAP et TAZ sont également impliqués dans l'inhibition de contact. Il a été montré que ces deux protéines sentent les modifications de la géométrie cellulaire qui reflètent la densité cellulaire et en fonction, adaptent leur régulation de la prolifération et de l'apoptose cellulaire (Gibson & Gibson 2009; Vogel & Sheetz 2006; Wada et al. 2011). Lorsque les cellules peuvent multiplier les contacts d'adhésion avec leur substrat et sont donc aplaties et étalées, YAP/TAZ sont localisés dans le noyau et promeuvent la prolifération. Au contraire, lorsque les cellules ont peu de contacts d'adhésion et sont donc plus arrondies, YAP et TAZ sont localisés dans le cytoplasme et les cellules vont plutôt être dirigées vers un arrêt du cycle ou l'apoptose (Figure 37) (Dupont et al. 2011; Halder et al. 2012; Aragona et al. 2013; Piccolo et al. 2014). Les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse de YAP/TAZ aux modifications de la morphologie de la cellule ne sont pas encore bien connus. Une étude a montré que





les filaments d'actine (F-actine) des fibres de stress régulent la phosphorylation de YAP/TAZ via LATS1/2 (Wada et al. 2011). Les protéines motrices de myosine associées aux filaments d'actine génèrent des forces contractiles et une tension intracellulaire qui régulent l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ pour moduler la prolifération (Dupont et al. 2011; Halder et al. 2012).

### ***Réponse aux stress oxydatifs***

Les cellules produisent continuellement des espèces réactives de l'oxygène (ROS). De multiples sources de stress comme les radiations peuvent déréguler la balance entre la production et la dégradation des ROS entraînant un stress oxydatif. Ces dernières années il a été mis en évidence que YAP et TAZ sont des acteurs de la réponse cellulaire au stress oxydatif (Ashraf & Pervaiz 2015; Mao et al. 2015). Il a été montré chez la souris que la surexpression de *Yap* dans le cœur protège les cardiomyocytes de la mort cellulaire induite par un traitement à l' $H_2O_2$  (Del Re et al. 2013). Une autre étude a montré que, dans les cardiomyocytes, YAP s'associe au facteur de transcription FOXO1 pour stimuler l'expression de gènes codants des agents antioxydants comme la catalase ou la MnSOD ce qui promeut la survie cellulaire (Shao et al. 2014). L'effet du stress oxydatif sur l'activité de YAP a fait l'objet de plusieurs études mais certains résultats sont contradictoires. Dans des cellules de gliomes, l'induction de ROS entraîne l'activation de YAP. Dans ce contexte, la protéine YAP activée s'associe à P73 et P300/CBP pour activer la transcription de gènes pro-apoptotiques (Dixit et al. 2014). De manière contradictoire, un étude a montré dans le foie chez la souris que le stress oxydatif inhibe l'expression de *Yap* via l'inactivation de GABP, un régulateur transcriptionnel de *Yap* (Wu et al. 2013). Une étude plus récente a également observé une inhibition de YAP en réponse au stress oxydatif. En effet, dans les cardiomyocytes, le stress oxydatif semble activer NF2 qui active à son tour MST1 entraînant une inhibition de l'activité transcriptionnelle de YAP (Matsuda et al. 2016). Une autre étude allant dans le même sens n'a pas observé d'activation de YAP suite au traitement à l' $H_2O_2$  de cellules HEK en culture. En revanche, les auteurs ont montré que dans ces mêmes cellules, la protéine TAZ est stabilisée et activée en réponse au stress oxydatif généré par l' $H_2O_2$  (Gandhirajan et al. 2016). Au regard des différents résultats, il semble que de plus amples investigations sont nécessaires pour mieux comprendre le rôle de YAP et TAZ dans la réponse cellulaire au stress oxydatif en fonction des différents contextes et tissus.

### ***Réponse aux dommages à l'ADN***

L'ADN des cellules est constamment exposé à différents agents génotoxiques comme les radiations UV où les stress oxydatifs. Des études ont montré que l'activité transcriptionnelle de YAP est importante pour l'induction de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN (Mao et al. 2015; Pefani & Neill 2016). Il a été montré qu'en réponse aux lésions de l'ADN, YAP interagit avec le facteur de transcription



P73 pour déclencher l'apoptose et empêcher l'expansion de populations cellulaires portant des anomalies de l'ADN (Hamilton et al. 2009; Weyden et al. 2012). Ainsi, alors que le complexe TEAD/YAP a une activité oncogénique par la stimulation de la prolifération, le complexe P73/YAP est suppresseur de tumeurs. YAP en se liant à P73 active la transcription de gènes cibles pro-apoptotiques tels que *Bax* et *Puma* (Strano et al. 2001). La voie de signalisation Hippo joue un rôle central dans la régulation de l'interaction entre YAP et P73. Elle est activée en réponse aux dommages à l'ADN et en plus d'augmenter la fraction cytoplasmique de YAP, elle favorise l'interaction de la fraction nucléaire restante avec P73 et donc l'apoptose (Matallanas et al. 2007; Hamilton et al. 2009; Pefani & Neill 2016).

D'autres études ont montré que YAP peut au contraire favoriser la survie des cellules atteintes de lésions de l'ADN (Mao et al. 2014; Ren et al. 2008; Fernandez-L et al. 2012). Par exemple, dans les cellules d'hépatocarcinome en culture, l'induction de dommages à l'ADN entraîne l'activation de SIRT1 qui promeut la translocation de YAP au noyau, son interaction avec TEAD et la prolifération (Mao et al. 2014). Il a également été montré que l'activation de YAP rend les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose induite par les UV ou les rayons gamma. En réponse aux radiations, YAP permet aux cellules d'entrer en mitose même si elles ont des lésions de l'ADN non réparées. Son action passe par l'activation de l'expression de l'IGF-2 (insulin like growth factor-2) et l'activation de la voie AKT (Fernandez-L et al. 2012).

Au regard de ces différents résultats, s'il est clair que la protéine YAP est impliquée dans la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN, il semble que son action soit à double tranchant tant elle est capable de promouvoir aussi bien l'apoptose que la survie cellulaire.

## 5.4. Dans la biologie des cellules souches

La recherche sur le rôle de YAP/TAZ dans la biologie des cellules souches a été importante cette dernière décennie et les études ont apporté de nombreuses évidences de l'implication de YAP/TAZ dans le maintien, l'auto-renouvellement et la division des cellules souches et des progéniteurs ainsi que dans la reprogrammation des cellules souches pluripotentes induites (Piccolo et al. 2014; Zhu et al. 2015; Wang et al. 2017).

### 5.4.1 Dans les cellules souches embryonnaires

La fonction de YAP/TAZ dans les cellules souches embryonnaires (ESCs) de mammifères a été étudiée mais reste controversée. Alors que certaines études ont montré que YAP est nécessaire pour l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence des ESCs mais pas pour leur différenciation, d'autres ont observé exactement le contraire (Varelas 2014; Kodaka & Hata 2015; Wang et al. 2017). Les premières études ont montré que YAP est fortement exprimé dans les ESCs de souris en cours d'auto-

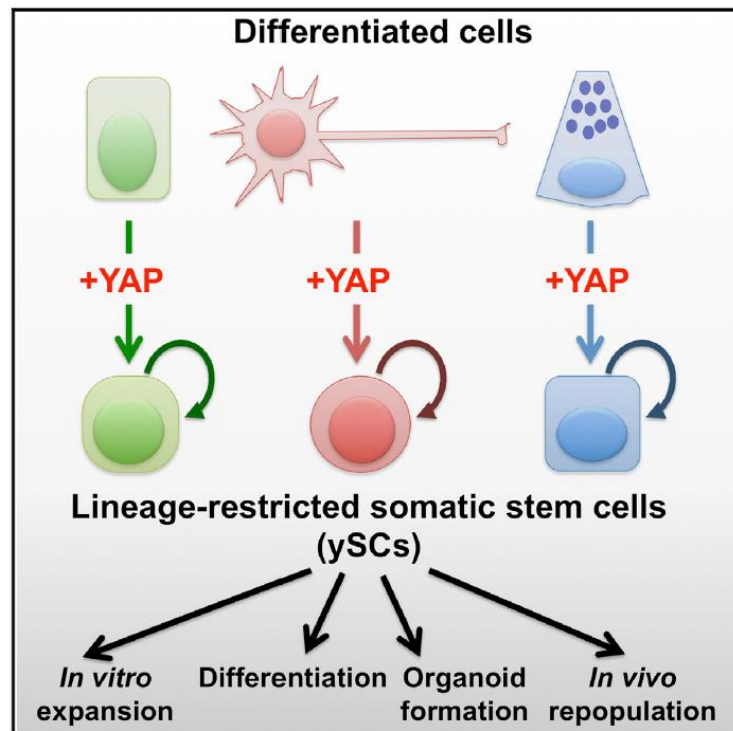


renouvellement mais que la protéine est inactive pendant leur différenciation (Lian et al. 2010; Tamm et al. 2011). Ces études suggèrent que YAP pourrait activer l'expression de gènes de pluripotence qui stimulent l'auto-renouvellement des ESCs. Il a en effet été montré que le complexe YAP-TEAD active 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). Par ailleurs, il a été montré que la surexpression de *Yap* inhibe la différenciation des cellules souches embryonnaires et permet le maintien de leur caractéristiques « souches » dans des conditions de culture favorisant la différenciation. A l'inverse, la délétion de *Yap* ou *Taz* entraîne une perte de leurs propriétés « souches » (Varelas et al. 2008; Lian et al. 2010; Tamm et al. 2011; Beyer et al. 2013). De manière cohérente, il a été montré que la délétion de *Mst1/2* dans les ESCs entraîne une augmentation de la prolifération et des défauts de différenciation (P. Li et al. 2013). Enfin, une étude a montré que la surexpression de *Yap* dans des ESCs humaines permet de les transformer en cellules souches pluripotentes naïves correspondant aux cellules souches de l'embryon au stade pré-implantatoire du développement (Qin et al. 2016). L'ensemble de ces études suggère donc que YAP est crucial pour le maintien de la pluripotence des ESCs.

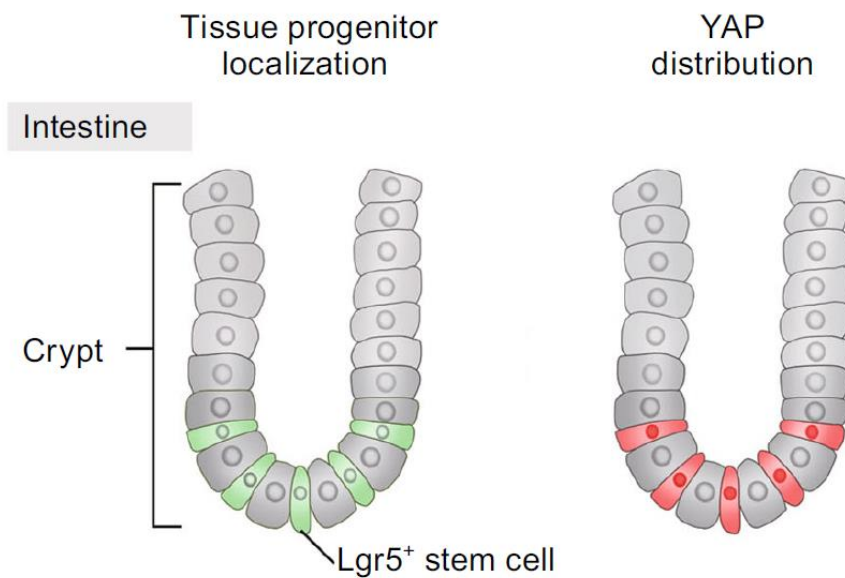
De manière contradictoire, certaines études suggèrent que YAP n'est pas indispensable pour l'auto-renouvellement des ESCs mais est nécessaire pour leur différenciation. Dans ces études, l'inhibition ou la délétion de *Yap* n'altère pas l'auto-renouvellement des ESCs mais empêche leur différenciation (Azzolin et al. 2014; Chung et al. 2016). Il semble également que TAZ et TEAD ne soient pas indispensables à l'auto-renouvellement des ESCs (Chung et al. 2016). Enfin, une troisième étude a montré que la délétion de *Lats2* dans les ESCs affecte à la fois leur pluripotence et leur capacité de différenciation (Aylon et al. 2014). Les contradictions entre les différentes études pourraient être due au fait que l'activité de YAP/TAZ est très sensible aux conditions de culture des cellules. Les différentes études sur les ESCs étant exclusivement *in vitro*, les protocoles et conditions de cultures peuvent varier d'une expérience à l'autre et expliquer les divergences dans les résultats.

#### **5.4.2 Dans les cellules souches pluripotentes induites**

Jusqu'en 2006 et la découverte par Shinya Yamanaka du protocole pour reprogrammer des cellules somatiques en cellules pluripotentes, les ESCs représentaient la seule source de cellules souches pluripotentes. Aujourd'hui, les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) représentent une source potentiellement inépuisable de cellules présentant les mêmes capacités de différenciation et d'auto-renouvellement que les ESCs. Ces cellules ont initialement été obtenues grâce à l'activité de quatre facteurs de transcription essentiels, KLF4, c-MYC, OCT4 et SOX2 (Takahashi & Yamanaka 2006). De plus en plus d'études suggèrent que YAP/TAZ est également un acteur clé de la reprogrammation des cellules somatiques en iPSCs. En 2010, il a été montré que la co-expression de *Yap* en plus des quatre



**Figure 38: Reprogrammation de cellules différenciées par YAP.** L'expression transitoire de Yap exogène induit la conversion de cellules primaires différenciées en cellules présentant les propriétés des cellules souches des tissus concernés. D'après (Panciera et al 2016).



**Figure 39: Expression de YAP dans les cellules souches intestinales.** Dans les cryptes intestinales, les cellules souches résidentes (en rouge) sont les cellules qui expriment YAP (en vert). D'après (Wang et al 2017).

facteurs de Yamanaka permet d'augmenter fortement l'efficacité de reprogrammation en iPSCs à partir de fibroblastes embryonnaires de souris (Lian et al. 2010). De façon cohérente, il a été constaté que l'inhibition de *Lats2* augmente l'efficacité de reprogrammation de fibroblastes humains en iPSCs (Qin et al. 2012). De la même façon, une étude récente a montré que la délétion du gène *Mst1* permet d'améliorer l'efficacité de reprogrammation de fibroblastes humains en iPSCs et, en plus, augmente la prolifération et la survie des iPSCs générées (Robertson et al. 2017). Enfin, chez la souris, une équipe a montré que l'expression transitoire de *Yap* ou *Taz* exogène est suffisante pour induire la conversion de cellules primaires différenciées issues de différents tissus en cellules présentant les propriétés des cellules souches des tissus concernés (Figure 38) (Panciera et al. 2016). Les auteurs ont ainsi reprogrammé des cellules de glandes mammaires, des neurones et des cellules acineuses pancréatiques en cellules souches spécifiques du tissu correspondant. Par exemple, les cellules obtenues après surexpression de *Yap* dans les cellules de glandes mammaires en culture présentent toutes les caractéristiques des cellules souches endogènes de la glande mammaire comme l'auto-renouvellement et la capacité à former des organoïdes *in vitro* et à reformer la glande mammaire *in vivo* après transplantation (Panciera et al. 2016). Il est intéressant de souligner que le maintien de l'état souche des cellules obtenues ne nécessite pas l'expression continue de *Yap/Taz*. Cette étude a ainsi montré que l'activation transitoire de YAP/TAZ exogène est suffisante pour induire un état souche tissu-spécifique stable puisque transmis à travers les générations.

#### **5.4.3 Dans les cellules souches adultes**

Le rôle de YAP/TAZ a été étudié dans différentes populations de cellules souches adultes avec un intérêt tout particulier pour les cellules souches intestinales, épidermiques, mésenchymateuses et hépatiques qui ont fait l'objet d'un grand nombre d'études (Zhao et al. 2011; Hiemer & Varelas 2013; Mo et al. 2014; Liu et al. 2012; Tremblay & Camargo 2012).

##### ***Cellules souches intestinales***

L'épithélium intestinal s'auto-renouvelle en permanence et est doté d'une capacité de régénération importante (Barker 2014). Ces processus reposent sur une population de cellules souches intestinales située à la base des cryptes intestinales. Ces cellules sont appelées Lgr5+ car elles expriment spécifiquement le récepteur Lgr5 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5) (Barker et al. 2007). Il a été montré que dans l'intestin adulte, YAP est exprimé dans les cellules Lgr5+ suggérant qu'il pourrait avoir un rôle dans la régulation de ces cellules souches et donc dans l'homéostasie tissulaire de l'intestin (Figure 39) (Barry et al. 2013).





La perte de *Yap* et *Taz* par « knock-out » conditionnel chez la souris ne semble pas induire de phénotype notable suggérant que YAP et TAZ ne sont pas indispensables au maintien de l'homéostasie intestinale (Cai et al. 2010; Zhou et al. 2011; Azzolin et al. 2014). En revanche, des études ont montré que la surexpression de *Yap* ou la délétion de *Lats1/2* ou *Mst1/2* dans l'intestin du rongeur entraînent l'expansion des cellules souches intestinales ainsi que des défauts dans leur différenciation. En effet, dans ces études, certaines cellules différenciées de l'intestin grêle, les cellules de Paneth et les cellules caliciformes sont perdues et l'accumulation de progéniteurs indifférenciés entraîne une hyperplasie du tissu (Camargo et al. 2007; Lee et al. 2008; Cai et al. 2010; Zhou et al. 2011; Imajo et al. 2015). YAP/TAZ et les kinases inhibitrices en amont semblent donc être bel et bien impliqués dans le fonctionnement des cellules souches intestinales.

### ***Cellules souches épidermiques***

L'épiderme est aussi un excellent modèle possédant des capacités de renouvellement et de régénération importantes, même à l'âge adulte. Ces capacités reposent sur les cellules souches épidermiques (Solanas & Benitah 2013; Goodell et al. 2015). La régulation de la balance prolifération/différenciation des cellules souches est essentielle au bon fonctionnement de ces processus. Des études chez la souris ont montré que YAP peut influencer la destinée des cellules souches épidermiques. Ce dernier est majoritairement exprimé dans le noyau des cellules souches épithéliales en prolifération et devient 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 délétion de *Yap in vivo* entraîne également une diminution du nombre de progéniteurs épithéliaux et diminue l'épaisseur de la peau des souris par manque de tissu épidermique (Schlegelmilch et al. 2011). Au contraire, l'expression d'une forme constitutivement active de YAP augmente fortement le nombre de progéniteurs épidermiques en prolifération au détriment des cellules différenciées ayant pour conséquence une augmentation de l'épaisseur de l'épiderme et l'hyperkératinisation de la peau (Schlegelmilch et al. 2011). 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). Une étude a identifié deux gènes cibles de YAP/TEAD impliqués dans la régulation de la prolifération des progéniteurs épidermiques : les gènes homéotiques *Hoxa1* et *Hoxc13* (M. Liu et al. 2015). Par ailleurs, une étude récente a montré que dans les cellules épidermiques en prolifération, YAP interagit avec le co-facteur WBP2 (WW-binding protein 2) ce qui entraîne une augmentation de la transcription des gènes cibles de YAP/TEAD (Walko et al. 2017). Contrairement à l'implication de la voie canonique Hippo dans les cellules souches intestinales, la délétion des kinases MST1/2 dans l'épiderme 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 la régulation de YAP/TAZ est spécifique du tissu.

### ***Cellules souches mésenchymateuses***

Des études ont mis en évidence l'implication de YAP/TAZ dans la destinée cellulaire des cellules souches mésenchymateuses. Ces dernières 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 il est établi aujourd'hui qu'elles sont présentes 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 (Yagi et al. 1999; Cui et al. 2003; Hong et al. 2005). RUNX2 est un facteur de transcription essentiel dans l'activation de l'ostéogénèse. La surexpression de *Taz* ou l'activation de la protéine TAZ dans des cellules souches mésenchymateuses de souris active la transcription des gènes cibles de RUNX2, stimule la production d'ostéoblastes (Hong et al. 2005; Byun et al. 2012). Au contraire, la perte de fonction de *Taz* dans les cellules souches mésenchymateuses mises en culture, dans des conditions favorisant l'ostéogénèse, provoque une absence de dépôt calcique, signe d'une différenciation en ostéoblaste défectueuse (Hong et al. 2005). De façon opposée, TAZ semble être un régulateur négatif de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en adipocytes. TAZ est donc impliqué dans le contrôle de la détermination de ces cellules souches. Certains travaux montrent que YAP agit également comme co-activateur de RUNX2 et l'expression d'une forme constitutivement nucléaire de YAP semble pouvoir stimuler l'ostéogénèse (Yagi et al. 1999; Dupont et al. 2011). De manière contradictoire, d'autres études décrivent YAP comme un co-répresseur de RUNX2 pour inhiber la transcription de gènes comme l'*ostéocalcine* et *Col10a1* dans les cellules souches mésenchymateuses ou les progéniteurs qui en dérivent (Zaidi et al. 2004; Deng et al. 2016). 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. Contrairement à TAZ, YAP inhibe aussi bien la formation d'ostéoblastes que la formation d'adipocytes à partir des cellules souches mésenchymateuses (Seo et al. 2013). Par ailleurs, une étude a montré que YAP stimule la prolifération des chondrocytes nouvellement formés mais ensuite inhibe la maturation de ces chondrocytes (Deng et al. 2016). Il semble donc que YAP soit impliqué dans la détermination

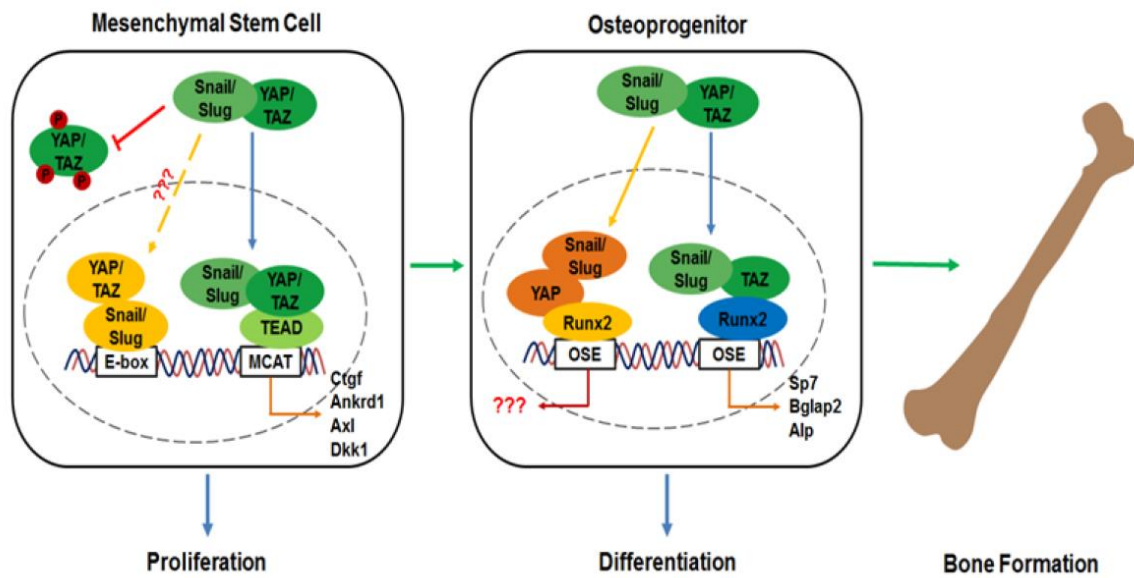


Figure 40: Modèle d'action des complexes Snail/Slug-YAP/TAZ dans la régulation des cellules souches mésenchymateuses. D'après (Tang et al 2017).

cellulaire des différentes lignées issues des cellules souches mésenchymateuses et à différents niveaux de prolifération et différenciation. Enfin, il a récemment été montré que les deux co-facteurs YAP et TAZ interagissent avec les facteurs SNAIL et SLUG dans les cellules souches mésenchymateuses et les progéniteurs pour réguler la prolifération et la différenciation de ces cellules (Figure 40) (Tang & Weiss 2017).

### ***Cellules souches hépatiques***

Le foie possède une capacité de régénération remarquable. Cette régénération repose en effet sur les hépatocytes matures qui prolifèrent pour compenser la perte de cellules et également sur des progéniteurs hépatiques résidents dans le tissu, appelés cellules ovales. Ces cellules ovales sont capables de générer à la fois des hépatocytes et des cellules épithéliales du canal biliaire et peuvent être considérées comme les cellules souches du foie (Miyajima et al. 2014). Ces dernières années, différentes études ont mis en évidence l'implication de YAP/TAZ dans la régulation de la prolifération des cellules hépatiques (Yimlamai et al. 2015; Hong et al. 2015). 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). De la même façon, la délétion des kinases MST1/2 entraîne une croissance excessive du foie associée à une accumulation importante de cellules ovales et génère des tumeurs (D. Zhou et al. 2009; Benhamouche et al. 2010; Lee et al. 2010; Lu et al. 2010; Song et al. 2010; Zhang et al. 2010; Lee et al. 2016; Yi et al. 2016). Ces données suggèrent donc que YAP/TAZ stimule la prolifération des cellules ovales dans le foie. Une étude récente a montré que YAP active également la prolifération des cellules épithéliales du canal biliaire *via* la voie de signalisation TGF $\beta$  (Lee et al. 2016). Dans cette même étude, il a été mis en évidence que YAP influence également la différenciation des cellules du foie en inhibant la différenciation en hépatocyte (Lee et al. 2016). De manière cohérente, il a été montré que l'activité de YAP est réduite pendant la différenciation en hépatocyte et que les hépatocytes matures expriment peu de YAP tout particulièrement au niveau nucléaire (Yimlamai et al. 2014; Yi et al. 2016). L'ensemble de ces résultats montre donc que YAP/TAZ joue un rôle crucial dans la destinée des cellules du foie. Il faut cependant noter qu'une étude a montré de façon contradictoire que l'expression d'une forme constitutivement active de *Yap* n'entraîne pas d'anomalies du foie bien que la protéine YAP soit accumulée au noyau (Chen et al. 2015). Des investigations plus approfondies ont permis de proposer que, dans ce contexte, YAP pourrait exercer un auto-contrôle négatif en stimulant l'expression des kinases LATS1/2 et NF2 (Chen et al. 2015; Moroishi et al. 2015).



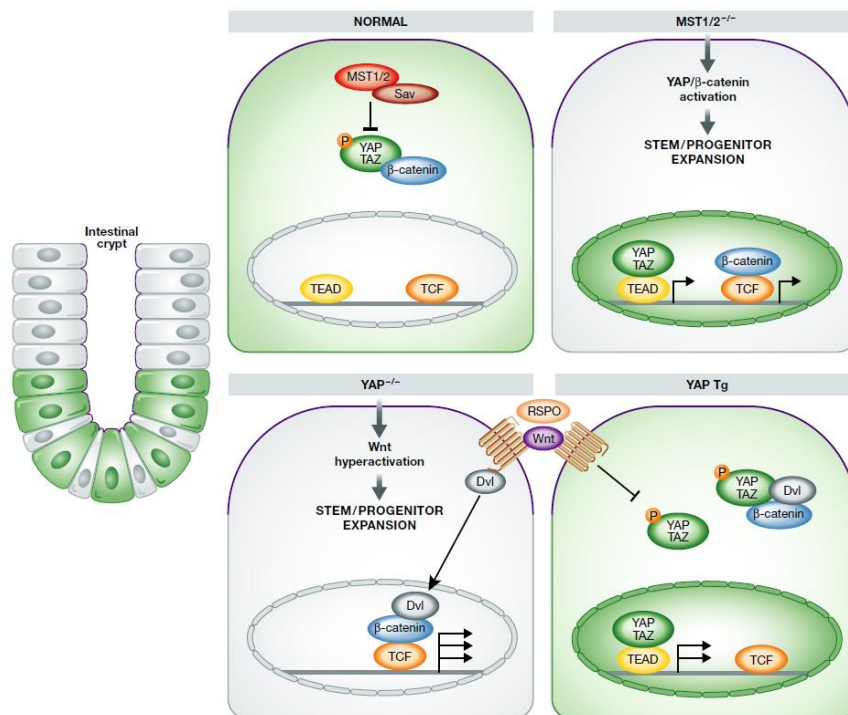
## 5.5. Dans la régénération tissulaire

Les processus de régénération et de réparation tissulaires impliquent la plupart du temps l'activation de la prolifération des populations de cellules souches adultes. Comme exposé précédemment, de nombreuses études ont mis en évidence que YAP et TAZ jouent un rôle crucial dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation de ces cellules dans plusieurs tissus. Ainsi, ces effecteurs de la voie Hippo possèdent des fonctions essentielles dans les mécanismes de régénération (Moya & Halder 2016; Wang et al. 2017). Dans cette partie, j'ai décidé d'exposer les principaux résultats obtenus à ce jour sur le rôle de YAP/TAZ dans la régénération des tissus les plus étudiés à savoir l'intestin, le foie, l'épiderme et le cœur mais également dans le système nerveux qui nous intéresse tout particulièrement.

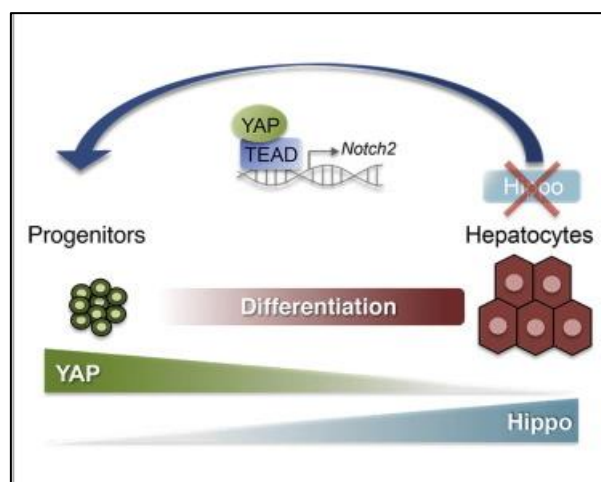
### 5.5.1 Régénération de l'intestin

Différentes études ont montré que YAP/TAZ joue un rôle important dans l'auto-renouvellement et la régénération de l'intestin en cas de lésion (F.-X. Yu et al. 2015). Dans une première étude utilisant le dextran sulfate de sodium (DSS) pour provoquer des lésions intestinales, il a été observé que le niveau protéique de YAP est très augmenté dans les cryptes intestinales après l'induction de la lésion. Dans les cellules des cryptes en régénération, YAP est localisé aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau (Cai et al. 2010). De la même façon, une étude utilisant les radiations gamma pour induire la lésion intestinale a montré que YAP est augmenté au cours de la régénération mais cette fois la localisation de YAP était principalement nucléaire (Gregorieff et al. 2015). Dans ces deux études, la perte de *Yap* ou de *Yap/Taz* par « knock-out » conditionnel affecte la régénération de l'intestin suite aux lésions causées par le DSS ou l'irradiation et entraîne une perte importante des cryptes intestinales (Cai et al. 2010; Gregorieff et al. 2015). A l'inverse, l'augmentation de l'activité nucléaire de YAP par la délétion de *Mst1/2* résulte en une accélération du processus de régénération (Cai et al. 2010; Zhou et al. 2011). Il a même été montré récemment que l'inhibition pharmacologique des kinases *Mst1/2* permet d'améliorer la régénération de l'intestin par stimulation de l'activité de YAP (Fan et al. 2016). Une étude a montré que, au cours de la régénération, YAP/TAZ active à la fois la prolifération des cellules souches intestinales et la différenciation de ces mêmes cellules en cellules caliciformes. Il semble que la régulation de ces deux processus par YAP/TAZ fasse intervenir des facteurs de transcription différents à savoir TEAD pour l'activation de la prolifération et KLF4 pour la stimulation de la différenciation en cellules caliciformes (Imajo et al. 2015). En parallèle de ces travaux, une étude 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





**Figure 41: 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  $\beta$ -caténine et inhibe la voie Wnt. Dans un épithélium intestinal mutant *Mst1/2<sup>-/-</sup>*, YAP n'est plus phosphorylé et peut transloquer dans le noyau et, de la même façon que la  $\beta$ -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/ $\beta$ -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).



**Figure 42: Rôle de YAP dans les progéniteurs hépatiques et dans les hépatocytes.** L'expression de YAP est nécessaire au maintien de la population de progéniteurs dans le foie et sa surexpression dans des hépatocytes mûres provoque la dédifférenciation de ces cellules. La voie Notch semble être une cible importante de YAP dans les hépatocytes. D'après (Yimlamai et al., 2014).

après irradiation des animaux. En accord avec ce résultat, la surexpression de YAP dans l'épithélium intestinal semble supprimer le renouvellement du tissu et réduire la population de cellules souches intestinales en inhibant la voie de signalisation Wnt (Barry et al. 2013). D'autres contradictions entre les différentes études concernent justement l'effet de YAP sur la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine dans le contexte de régénération (Figure 41) (Mo et al. 2014). Alors que dans certains cas l'activation de YAP semble inhiber la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, dans d'autres cas elle semble au contraire l'activer. Il semble donc que l'effet de YAP sur la voie Wnt/ $\beta$ -caténine soit complexe et contexte dépendant (Barry et al. 2013; Gregorieff et al. 2015; Oudhoff et al. 2016). Des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre l'ensemble des contradictions obtenues sur le rôle de YAP/TAZ dans la régénération intestinale.

### 5.5.2 Régénération du foie

Différentes études ont mis en évidence que YAP joue un rôle dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules hépatiques au cours de la régénération. Dans le foie adulte, la protéine YAP est principalement retrouvée dans les cellules épithéliales du canal biliaire (Yimlamai et al. 2014). 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 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). Des études ont montré chez la souris que cette activation de YAP suite à une lésion du foie conduit à l'activation de la prolifération des progéniteurs et à l'inhibition de leur différenciation en hépatocytes. De manière cohérente, la délétion de *Yap* dans le foie adulte résulte en l'inhibition de la prolifération des hépatocytes et des cellules du canal biliaire après une lésion du foie (Bai et al. 2012; Su et al. 2015). Par ailleurs, il a été montré que l'activation ectopique de YAP au sein des hépatocytes matures est capable de provoquer leur dédifférenciation en cellules présentant des caractéristiques semblables à celles des cellules du canal biliaire. L'induction de la dédifférenciation des hépatocytes par YAP semble passer par l'activation de la voie Notch (Figure 42) (Yimlamai et al. 2014). Peu de choses sont connues sur les mécanismes moléculaires régulant la fonction de YAP au cours de la régénération du foie. Il a été montré que l'inhibition pharmacologique des kinases Mst1/2 permet d'améliorer la régénération du foie par stimulation de l'activité de YAP (Fan et al. 2016). Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence que l'activation de YAP dans cellules hépatiques au cours de la régénération est dépendante de la voie de signalisation Hedgehog (Swiderska-Syn et al. 2016).



### 5.5.3 Régénération de l'épiderme

YAP/TAZ étant impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules souches épidermiques, leur rôle dans la régénération de la peau a été étudié. Il a été montré que la délétion de *Yap* ou l'inhibition de *Yap/Taz* conduit à une diminution de la prolifération cellulaire, à une inhibition de la différenciation en kératinocyte et à un retard de la cicatrisation cutanée (Lee et al. 2014; Elbediwy et al. 2016). La perte de fonction de YAP/TAZ a également permis de montrer que l'action de YAP/TAZ sur les cellules souches épidermiques passe par l'activation de la voie de signalisation TGF $\beta$ . L'inhibition de YAP/TAZ entraîne en effet une diminution de l'expression de TGF $\beta$ 1 et d'autres composants de la voie au site de la lésion (Lee et al. 2014). Bien qu'elles soient encore peu nombreuses, différentes études ont ainsi montré que YAP/TAZ joue un rôle crucial dans la régénération de l'épiderme et est nécessaire à la bonne cicatrisation des plaies cutanées.

### 5.5.4 Régénération du tissu cardiaque

Contrairement au foie, le cœur a longtemps été considéré comme un organe incapable de régénérer. Récemment, il a cependant été mis en évidence que le tissu cardiaque n'est pas totalement dénué de capacités régénératives (Laflamme & Murry 2011; Porrello et al. 2011; Porrello & Olson 2014; Zhou et al. 2015). Au cours du 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. Le potentiel régénératif du tissu cardiaque chez l'adulte est faible et la récupération morphologique et fonctionnelle suite à une lésion est limitée. Il pourrait être en fait plus approprié de parler de réparation tissulaire plutôt que de véritable régénération. YAP est exprimé dans le myocarde au cours du développement et chez l'adulte mais son niveau d'expression réduit avec l'âge (von Gise et al. 2012; Lin et al. 2016). Ces dernières années, plusieurs publications ont démontré le rôle essentiel de YAP dans la régulation de la prolifération des cardiomyocytes, suscitant ainsi la possibilité que ce facteur pourrait améliorer les capacités régénératives du tissu cardiaque (Heallen et al. 2011; von Gise et al. 2012; Papizan & Olson 2014; Zhang & Del Re 2017). Ainsi, il a été montré que la surexpression d'une forme constitutivement active de YAP ou l'inactivation de *Sav1* ou *Lats1/2* sont capables d'améliorer les capacités de régénération et de réduire les lésions du myocarde (Xin et al. 2013; Heallen et al. 2013; Lin et al. 2014). Au contraire, la délétion conditionnelle de *Yap* dans les cardiomyocytes inhibe les processus de régénération (Xin et al. 2013). Le rôle de YAP dans la régulation de la prolifération des cardiomyocytes adultes après une lésion a été étudié. Il a été montré que chez l'adulte, la surexpression de *Yap* 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 *Mst1/2*, *Lats1/2* ou du gène *Sav1* dans les cardiomyocytes adultes (Heallen et al. 2013; Morikawa et al. 2015). YAP promeut la réparation du tissu cardiaque par différents mécanismes. Une étude a montré que YAP semble réguler la réponse inflammatoire importante dans le processus de régénération (Lin et al. 2014). L'analyse de profils d'expression a montré que YAP active l'expression de gènes associés à la prolifération, à la synthèse d'ADN et au remodelage du cytosquelette (von Gise et al. 2012; Morikawa et al. 2015). De plus, YAP stimule les voies de signalisation IGF-1 et PI3K/AKT pour réduire l'apoptose des cardiomyocytes (Xin et al. 2011; Del Re et al. 2013; Xin et al. 2013). Enfin, il a été montré que YAP interagit avec des facteurs de transcription autres que TEAD dans le cœur. Il s'associe par exemple à FOXO1 et PITX2 pour promouvoir l'expression de gènes impliqués dans la réponse anti-oxydante (Shao et al. 2014; G. Tao et al. 2016). L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que YAP pourrait être un candidat intéressant pour stimuler la prolifération des cardiomyocytes en réponse à une lésion et donc la régénération du cœur.

## 6. YAP/TAZ dans le système nerveux

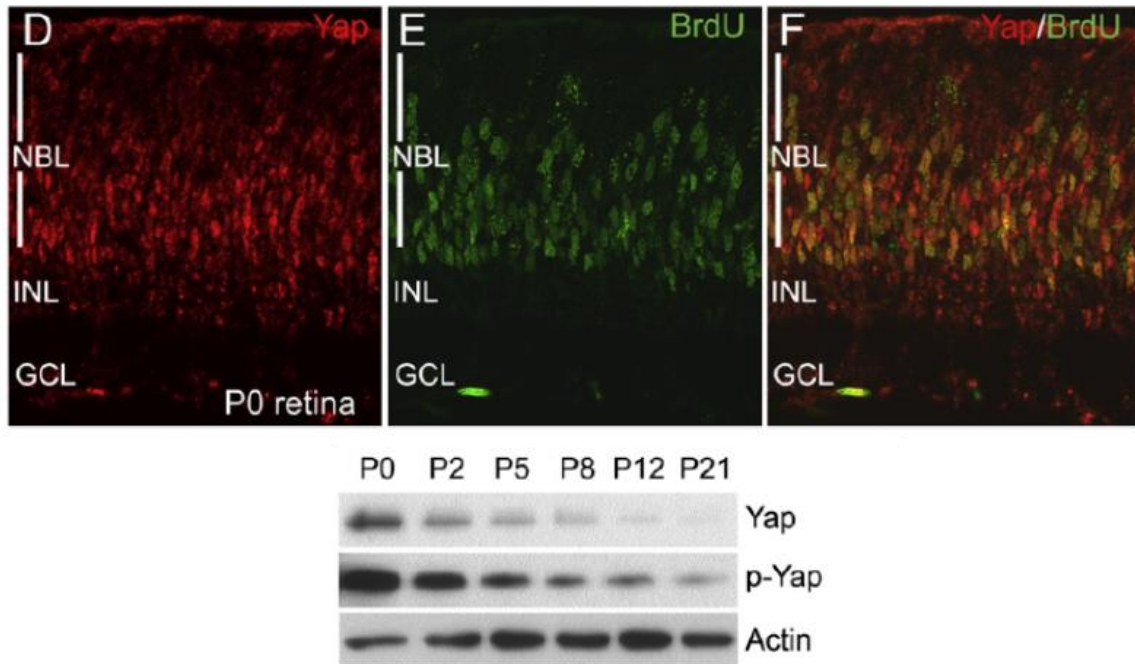
### 6.1. YAP/TAZ dans le cerveau

Très peu de choses sont connues sur le rôle de YAP/TAZ dans le cerveau adulte. Une étude a montré de manière surprenante que YAP ne semble pas nécessaire à la prolifération des cellules souches neurales adultes en conditions physiologiques (Huang, Hu, et al. 2016). En revanche, ces dernières années plusieurs études se sont penchées sur le rôle de YAP/TAZ au cours du développement du système nerveux. Ainsi, différentes études ont mis en évidence le rôle de YAP dans la régulation du nombre de progéniteurs neuraux au cours du développement du système nerveux chez différentes espèces de vertébrés (Piccolo et al. 2014; Wang et al. 2017). Dans le tube neural de xénope, poulet et souris, YAP est exprimé dans les progéniteurs neuraux de la zone ventriculaire (Milewski et al. 2004; Cao et al. 2008; Gee et al. 2011). Il a été montré que la surexpression de *Yap* dans le tube neural de poulet et de xénope conduit à une diminution de la différenciation neuronale et à une expansion de la population des progéniteurs en prolifération (Cao et al. 2008; Gee et al. 2011). Ce phénotype est en partie dû à l'activation de l'expression de gènes du cycle cellulaire comme *cycline D1* et à l'inhibition de l'expression de gènes comme *NeuroM* ou *p27<sup>Xic1</sup>* nécessaires à la sortie du cycle cellulaire (Cao et al. 2008). Dans ce contexte l'activité transcriptionnelle de YAP semble être dépendante de TEAD puisque la surexpression d'une forme de YAP délétée de son domaine d'interaction avec les protéines TEADs n'augmente pas le nombre de progéniteurs dans le tube neural (Cao et al. 2008). Dans ce même modèle, l'inhibition de l'activité de YAP ou TEAD par la surexpression de formes dominantes négatives,



a pour conséquence une augmentation de la mort cellulaire par apoptose, une sortie de cycle précoce ainsi qu'une différenciation prématurée des progéniteurs neuraux (Cao et al. 2008). Chez la souris aussi des études ont montré l'implication de YAP dans la régulation du nombre de progéniteurs neuraux au cours du développement. Il a été montré que *Nf2* joue un rôle crucial dans la limitation de la prolifération des progéniteurs neuraux en régulant négativement l'activité de YAP et TAZ dans la région dorsale du télencéphale (Lavado et al. 2013). En effet, l'inactivation de *Nf2* dans le télencéphale dorsal entraîne une expansion importante des progéniteurs neuraux dans l'hippocampe et le néocortex conduisant à des malformations du corps calleux et de l'hippocampe. La surexpression de *Yap* conduit au même phénotype que la perte de *Nf2* (Lavado et al. 2013; Lavado et al. 2014). De manière surprenante, il a été montré que la perte de *Yap* n'affecte pas la neurogenèse néocorticale (Huang, Hu, et al. 2016). En revanche, YAP est impliqué dans la régulation de la prolifération des astrocytes du néocortex et est nécessaire à l'astroglionèse néocorticale (Huang, Hu, et al. 2016). De plus, il semble que YAP prévient l'astroglie réactive. Il a en effet été montré que les astrocytes déficients en YAP présentent une hyperactivité de la voie inflammatoire JAK/STAT associée à une astroglie réactive (Huang, Wang, et al. 2016). Par ailleurs, il semble que YAP soit nécessaire pour la genèse des cellules épendymaires. Il a été montré que la délétion de *Yap* dans le système nerveux affecte la formation des cellules épendymaires et conduit à une hydrocéphalie (Park et al. 2016). Enfin, une étude récente a montré que YAP et TAZ sont également impliqués dans le développement du système nerveux périphérique. Ils régulent la prolifération des cellules de Schwann et sont ainsi nécessaires à la mise en place des nerfs périphériques et à leur myélinisation (Poitelon et al. 2016). Pour conclure, les études effectuées sur le rôle de YAP/TAZ au cours du développement du système nerveux s'accordent pour dire que l'activation de YAP/TAZ dans les progéniteurs neuraux suffit à augmenter leur prolifération et inhiber leur différenciation. En revanche, les expériences de perte de fonction sont parfois discordantes et l'implication de YAP/TAZ au cours du développement semble être dépendante du type cellulaire concerné. Il est intéressant de noter que les protéines YAP/TAZ semblent tout particulièrement importantes pour la formation de différents types de cellules gliales du système nerveux à savoir les astrocytes, les cellules épendymaires et les cellules de Schwann.





**Figure 43: Expression de YAP dans la rétine post-natale de souris.** (D-F) Immunofluorescence sur coupes de rétine à P0. (D) La protéine YAP est présente dans les noyaux des cellules de la couche des neuroblastes (NBL) et (E,F) co-localise avec les cellules en phase S marquées avec le BrdU. (H) Western-blot montrant que le niveau protéique de YAP diminue à partir de P2 et au fur et à mesure que la neurogénèse diminue dans la rétine post-natale. La  $\beta$ -actine est utilisée comme contrôle de charge. INL : Couche nucléaire interne ; GCL : Couche des cellules ganglionnaires. D'après (Zhang et al 2012).

## 6.2. YAP/TAZ dans la rétine

Je souhaite exposer dans cette partie l'ensemble des connaissances accumulées à ce jour sur l'expression et le rôle de YAP/TAZ dans la rétine.

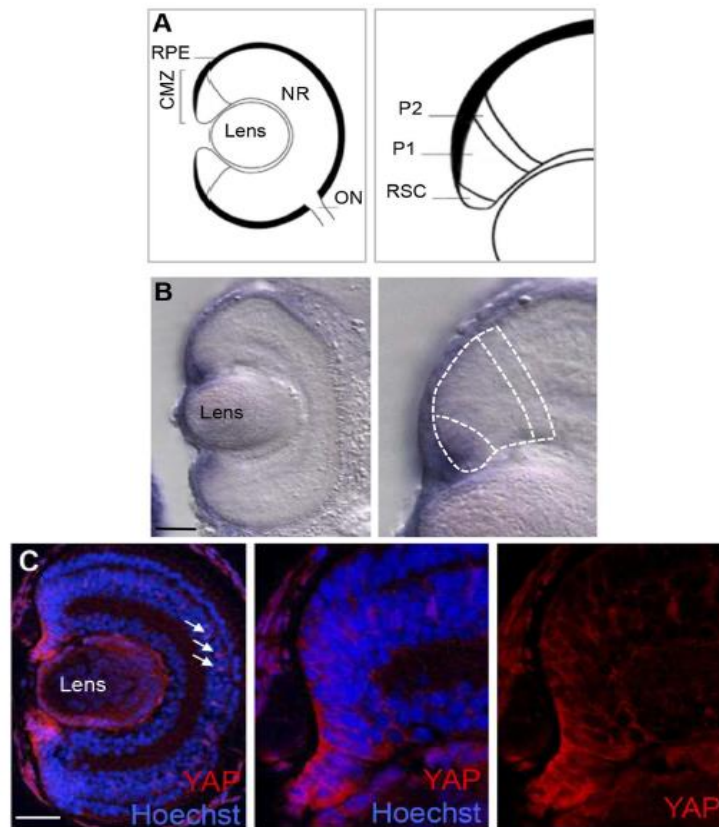
### 6.2.1 Expression de YAP/TAZ dans l'œil

Le profil d'expression de YAP/TAZ dans l'œil de mammifère adulte n'avait jamais été déterminé avant les travaux réalisés au cours de ma thèse. En revanche, plusieurs études avaient mis en évidence l'expression de YAP dans différentes structures de l'œil au cours du développement chez différentes espèces. Chez le poisson zèbre, une équipe a réalisé l'analyse de l'expression de *Yap in toto* au cours du développement et a montré que ce gène est fortement exprimé dans les yeux du poisson (Jiang et al. 2009). Par la suite, 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) a permis de mettre en évidence une forte activité de ce complexe dans le cristallin et l'EPR du poisson (Miesfeld & Link 2014). Chez la souris, au cours du développement embryonnaire, l'expression de *Yap* dans l'œil est clairement visible dès le stade E10.5 (particulièrement marquée dans l'extrémité distale des cupules optiques) (Williamson et al. 2014). Les immunomarquages réalisés par cette même équipe ont montré plus précisément l'expression de YAP au sein de la rétine présomptive, de la vésicule cristallinienne et du futur nerf optique. Enfin, une étude a montré qu'au cours de la première semaine du développement post-natal, *Yap* est exprimé dans les progéniteurs rétiniens en prolifération (Figure 43) (Zhang et al. 2012).

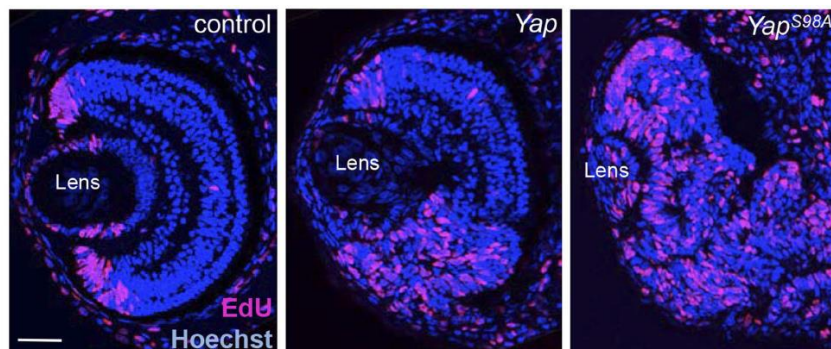
Au cours de ma thèse, une équipe a réalisé l'analyse de l'expression de YAP au cours du développement oculaire précoce. Cette étude a montré que la protéine YAP est présente dans l'EPR, le corps ciliaire, le cristallin et la rétine présomptifs à E10.5 (Kim et al. 2016). Dans la rétine présomptive, les auteurs ont montré que YAP est spécifiquement exprimé dans les progéniteurs rétiniens. Enfin, mes collègues de l'équipe travaillant avec le modèle du xénope ont publié une étude dans laquelle ils montrent que dans la rétine post-embryonnaire du xénope, *Yap* est exprimé dans les cellules souches les plus périphériques de la zone marginale ciliaire (Figure 44) (Cabochette et al. 2015).

### 6.2.2 Rôles de YAP/TAZ dans la rétine

A ma connaissance, aucune étude n'a exploré le rôle de YAP et TAZ dans la rétine adulte. En revanche, plusieurs études ont été réalisées au cours du développement chez le poisson zèbre, le xénope et la souris. D'une manière globale, des études de perte et gain de fonction ont montré que YAP et TAZ sont



**Figure 44: Expression de YAP dans les cellules souches rétiniennes du têtard.** (A) Schéma d'une coupe transversale de rétine de têtard. (CMZ: zone marginale ciliaire; RPE : Epithélium pigmentaire rétinien ; NR : neuro-rétine ; ON : nerf optique). Dans la CMZ, les cellules souches rétiniennes (RSC) résident dans la zone la plus périphérique alors que les progéniteurs en prolifération (P1) et leur progéniture post-mitotique (P2) sont localisés plus centralement. (B) Analyse par hybridation *in situ* de l'expression de Yap sur des sections de rétines au stade 40. L'image à droite est un agrandissement de la CMZ (les lignes pointillées délimitent les différentes zones comme en A). (C) Immunofluorescence à l'aide d'anticorps anti-YAP sur sections de rétine au stade 42. Le marquage YAP est détecté dans la CMZ. Les images à droite sont des agrandissements de la CMZ. D'après (Cabochette et al 2015).



**Figure 45: Surexpression de Yap dans la rétine de têtard.** Analyse d'expérience d'incorporation d'EdU sur coupes de rétines de têtard au stade 40. L'injection d'ARNm Yap ou YapS98A (forme constitutivement active) entraîne l'augmentation du nombre de cellules en prolifération. D'après (Cabochette et al 2016).

nécessaires au bon développement de l'œil et la rétine. Comme dans les autres tissus, YAP et TAZ semblent être impliqués dans la régulation de la balance prolifération/différenciation des progéniteurs rétiniens ainsi que dans leur survie (Jiang et al. 2009; Cabochette et al. 2015; Kim et al. 2016).

### ***Prolifération et spécification des cellules de l'EPR***

Des études chez le poisson zèbre ont montré que les facteurs YAP et TAZ sont impliqués dans la formation de l'EPR. Une première étude a montré que 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). De manière totalement contradictoire, une autre étude a montré que YAP et TAZ sont nécessaires et suffisants pour déclencher la différenciation des progéniteurs en cellules de l'EPR. En effet, dans cette étude, la perte de *Yap* entraîne des défauts de formation de l'EPR et quand à la fois *Yap* et *Taz* sont perdus, les progéniteurs de la vésicule optique sont incapables de former l'EPR. A l'inverse, la surexpression de *Yap* et *Taz* conduit à de la pigmentation ectopique (Miesfeld et al. 2015).

Chez la souris, une étude a montré que le co-activateur TAZ est impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules de l'EPR *in vitro*. Les auteurs ont en effet mis en évidence que TAZ contrôle l'expression du gène *Zeb1* qui est nécessaire pour promouvoir la dédifférenciation et la prolifération des cellules de l'EPR en culture (Liu et al. 2010). Dans une étude plus récente, les auteurs ont observé que la délétion du gène *Yap* entraîne des défauts importants de développement de l'EPR. Ce dernier présente une perte de la pigmentation, une morphologie d'épithélium pseudostratifié et même l'expression ectopique de marqueurs de progéniteurs rétiniens suggérant une transdifférenciation en cellules rétinienne (Kim et al. 2016). Il semble donc que YAP et TAZ soient cruciaux pour la prolifération et la spécification des progéniteurs en cellules de l'EPR.

### ***Régulation de la prolifération cellulaire***

Chez le xénope, mes collègues ont montré que la surexpression de *Yap* via l'injection de mRNA *Yap* conduit à une augmentation importante du nombre de cellules en prolifération qui ne sont alors plus cantonnée à la zone marginale ciliaire (Figure 45) (Cabochette et al. 2015). Chez la souris, il a été montré que la surexpression de *Yap*, par électroporation *in vivo* d'un vecteur d'expression à P0, permet de prolonger la prolifération dans la rétine post-natale. A l'inverse, la perte de fonction de *Yap* par siRNA aboutit à une diminution de l'incorporation de BrdU dans la rétine embryonnaire associée à une différenciation prématurée des progéniteurs rétiniens (Zhang et al. 2012). Plus récemment, une étude utilisant un modèle génétique de « knock-out » conditionnel de *Yap* dans les tissus oculaires en développement a montré que YAP est nécessaire à la prolifération des progéniteurs rétiniens mais pas au maintien de leur identité de progéniteurs (Kim et al. 2016). Dans cette même étude, il a été montré



que la surexpression de *Yap* par électroporation dans des explants à E15.5 est suffisante pour doubler le nombre de cellules en prolifération (Kim et al. 2016). L'ensemble de ces résultats montre que YAP est impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules souches rétiniennes dans les modèles qui en sont pourvus comme le xénope. Chez les mammifères, YAP est crucial pour la prolifération des progéniteurs rétiniens au cours du développement précoce et post-natal de la rétine.

### **Régulation du cycle cellulaire**

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de YAP dans la régulation de la progression du cycle cellulaire des cellules souches et progéniteurs rétiniens. Chez la souris, une étude a montré que le phénotype d'hyperprolifération observé dans les expériences de gain de fonction de *Yap* dans la rétine en développement est associé à un retard de la sortie du cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens (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*. Par ailleurs, une équipe a observé indirectement les fonctions de YAP sur le cycle cellulaire dans la rétine. Dans cette étude, les auteurs ont montré 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). Une étude récente utilisant un modèle génétique de « knock-out » conditionnel de *Yap* a confirmé que la perte de *Yap* affecte la progression dans le cycle cellulaire des progéniteurs rétiniens (Kim et al. 2016). Chez le xénope, mes collègues ont également observé des modifications de la progression du cycle cellulaire des cellules souches de la rétine post-embryonnaire en perte de fonction de *Yap*. Dans ce modèle, si la durée totale du cycle cellulaire est rallongée, la phase S est, elle, raccourcie (Cabochette et al. 2015). L'étude de la dynamique de réplication a permis de montrer que YAP est tout particulièrement impliqué dans la régulation du programme temporel de la réplication au cours de la phase S (Cabochette et al. 2015). L'ensemble de ces résultats montre que YAP est nécessaire au bon déroulement du cycle cellulaire des cellules souches et progéniteurs rétiniens.

### **Survie cellulaire**

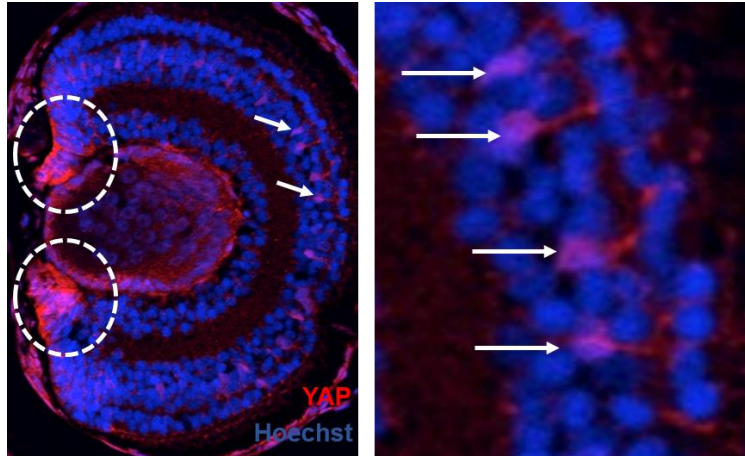
Dans la rétine post-natale de souris, l'inhibition du gène *Yap* par siRNA augmente de façon très modeste le nombre de cellules en apoptose (Zhang et al. 2012). En revanche, la délétion génétique de *Yap* entraîne une augmentation très importante du nombre de cellules apoptotiques dans la rétine post-natale (P0) (Kim et al. 2016). Les auteurs de cette étude ont observé jusqu'à 25 fois plus de cellules en apoptose dans les rétines déficientes pour *Yap* que dans les rétines sauvages. Ainsi, les résultats de ces deux études montrent que YAP est nécessaire à la survie des progéniteurs rétiniens.



### 6.2.3 YAP/TAZ et maladies de la rétine

YAP et TAZ sont indirectement impliqués dans certaines pathologies ophtalmologiques dont certaines touchant la rétine. Ainsi, le régulateur NF2 est muté dans la maladie du même nom, la neurofibromatose de type II. Les patients atteints de cette maladie autosomique dominante ont de forts risques de développer des cataractes et des anomalies rétiniennes (Meyers et al. 1995; Parry et al. 1996). Il a par ailleurs été montré que les souris « knock-out » pour NF2 développent des cataractes (Giovannini et al. 2000). Chez l'homme, des mutations non-sens de *Yap* ont été identifiées comme étant la cause de colobome oculaire (Williamson et al. 2014). Dans l'atrophie chorioretinienne de Sveinsson, une maladie caractérisée par une dégénérescence de la choroïde et de la rétine, le gène *Tead1* est soit délété soit muté au niveau d'un résidu important pour son interaction avec YAP/TAZ (Fossdal et al. 2004; Kitagawa 2007).





**Figure 46: Localisation de la protéine YAP dans la rétine post-embryonnaire du xénope.** 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 entourée d'un cercle sur la photographie (dans la zone contenant les cellules souches et les jeunes progéniteurs rétiniens) et dans certaines cellules dans la rétine centrale (flèches). Agrandissement de la région centrale de la rétine. Les flèches indiquent les cellules marquées par l'anticorps anti-YAP et qui ont la morphologie des cellules de Müller. D'après (Cabochette et al. 2015)

## IV. OBJECTIFS DE MON TRAVAIL DE THESE

L'objectif général de mon projet de Thèse était d'explorer le rôle potentiel de la voie de signalisation Hippo/YAP dans la réactivation des cellules de Müller chez la souris.

Quand je suis arrivée au laboratoire, mes collègues qui étudiaient le rôle de YAP dans les cellules souches de la zone marginale ciliaire de la rétine du xénope, avaient remarqué que la protéine était également présente dans certaines cellules de la rétine centrale qui pouvaient être les cellules de Müller (Figure 46). Ma collègue Christel Masson, chercheuse de l'équipe, avait alors réalisé les premières expériences d'immunofluorescence qui montraient que chez la souris aussi, YAP semblait être exprimé dans les cellules de Müller. Le fait de retrouver YAP spécifiquement dans les cellules rétinienne possédant un potentiel régénératif chez le mammifère et d'autres espèces, a constitué le point de départ de mon projet de Thèse, et de fait un nouvel axe de recherche au laboratoire.

L'étude des mécanismes moléculaires régissant le comportement des cellules de Müller représente en effet un intérêt majeur dans le but de pouvoir un jour stimuler le potentiel neurogénique de ces cellules et donc la régénération endogène de la rétine. La recherche dans ce domaine est en plein essor depuis la découverte du potentiel neurogénique des cellules de Müller chez le poisson zèbre en 2006 et de nombreuses voies de signalisation ont été étudiées dans ce contexte. Pourtant, malgré son rôle émergent dans la régénération de tissus tels que le cœur ou le foie et dans la biologie des cellules souches, l'implication de la voie Hippo/YAP dans la régénération de la rétine n'avait jamais été explorée, ni chez la souris, ni chez d'autres espèces.

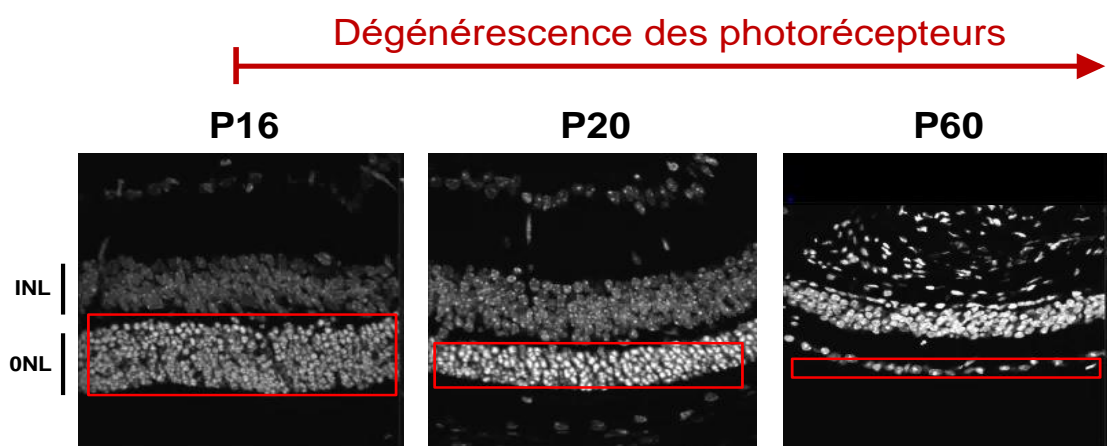
Ainsi, dans un premier temps, j'ai initié en collaboration avec Christel Masson, des analyses d'expression des composants de la voie Hippo et plus spécifiquement de l'effecteur YAP dans la rétine de souris adulte en condition physiologique et en condition pathologique de dégénérescence rétinienne dans un modèle de rétinite pigmentaire, le souris *rd10*. Par la suite, l'objectif de mon travail a été de réaliser une étude fonctionnelle de la protéine YAP dans les cellules de Müller, là encore à la fois en conditions physiologiques et de dégénérescence rétinienne afin d'évaluer son implication dans la réactivation des cellules de Müller.



---

# RESULTATS

---



**Figure 47: Modèle *rd10* de dégénérescence rétinienne.** Coupes de rétines de souris à différents stades montrant l'évolution de la dégénérescence rétinienne. L'amincissement progressif de la couche des photorécepteurs est souligné par le rectangle rouge.

# RESULTATS

## I. ETUDE DE L'EXPRESSION ET DE L'ACTIVITE DE YAP DANS LA RETINE EN CONDITIONS PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE DE DEGENERESCENCE RETINIENNE

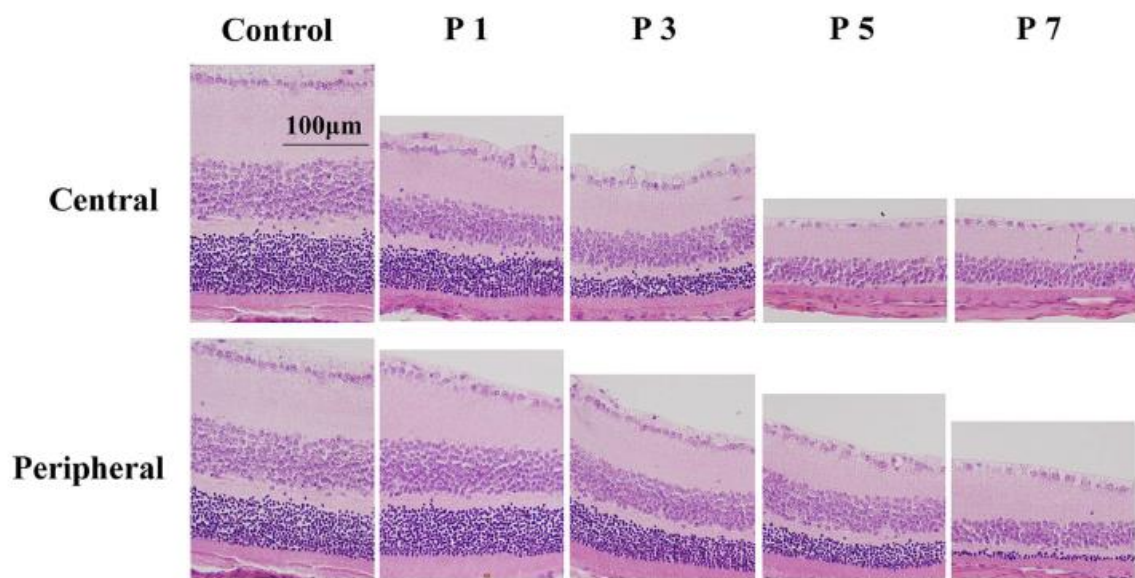
Le laboratoire travaillant depuis quelques années sur la voie Hippo/YAP dans les cellules souches rétinienne du xénope, c'est logiquement que le projet que nous avons développé, dans le but de découvrir de nouveaux acteurs de la réactivation des cellules de Müller au cours de la dégénérescence rétinienne chez la souris, s'est orienté vers cette même voie de signalisation, et plus particulièrement vers son effecteur YAP.

### Publication associée :

**Hamon A\***, Masson C\*, Bitard J, Gieser L, Roger JE, Perron M. Retinal Degeneration Triggers the Activation of YAP/TEAD in Reactive Müller Cells. (2017) *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 58(4):1941-1953

### 1. Modèles utilisés

Nous avons utilisé deux modèles de dégénérescence rétinienne dans cette étude. Le principal modèle est un **modèle génétique de rétinite pigmentaire**. Il s'agit de la souris *rd10*. Cette souris porte une mutation autosomale récessive ponctuelle dans l'exon 13 du gène *Pde6b* qui code pour la sous unité  $\beta$  de la phosphodiesterase-6, une enzyme impliquée dans la phototransduction dans les photorécepteurs de type bâtonnets (Chang et al. 2002). La mutation de cette enzyme conduit à la mort par apoptose des bâtonnets à partir de l'âge de 16 jours (P16). La dégénérescence des bâtonnets entraîne par la suite la dégénérescence des photorécepteurs de type cônes. A l'âge de P60, la rétine de souris *rd10* ne compte plus aucun photorécepteur de type bâtonnet et seulement quelques cônes ([Figure 47](#)) (Gargini et al. 2007; Barhoum et al. 2008; Pennesi et al. 2012).



**Figure 48: Evolution de la dégénérescence des photorécepteurs dans le modèle MNU.** Coupes histologiques au niveau central et périphérique de la rétine de souris contrôles ou injectées avec du MNU au cours du temps (de 1 jours à 7 jours après l'injection). D'après (Tao et al. 2015).

Nous avons également utilisé le **modèle pharmacologique** d'induction de la dégénérescence par injection intrapéritonéale de N-méthyl-N-nitrosourea (MNU), un agent alkylant qui induit des cassures double brin de l'ADN. Dans la rétine, les photorécepteurs qui sont les cellules les plus sensibles au MNU meurent par apoptose. La dégénérescence des photorécepteurs est rapide puisqu'il ne reste plus de photorécepteurs au niveau de la rétine centrale 7 jours après l'injection (Figure 48) (Chen et al. 2014; Tao et al. 2015).

## 2. Principaux résultats

- La voie de signalisation Hippo/YAP est une des voies les plus dérégulées au cours de la dégénérescence rétinienne chez la souris *rd10*.
- Les effecteurs de la voie Hippo/YAP, *i.e.* le co-facteur de transcription YAP et son partenaire TEAD, sont spécifiquement exprimés dans les cellules gliales de Müller dans la rétine de souris adulte.
- L'expression et l'activité transcriptionnelle du complexe YAP/TEAD sont augmentées dans les cellules de Müller réactivées en réponse à la mort des photorécepteurs.

Dans l'ensemble, il s'agit donc de la première étude qui suggère un lien entre réactivation des cellules de Müller et voie de signalisation Hippo/YAP.





## **Article n°1**

Annaïg Hamon\*, Christel Masson \*, Juliette Bitard, Linn Gieser, Jérôme E. Roger, Muriel Perron.

(2017)

**Retinal Degeneration Triggers the Activation of YAP/TEAD in  
Reactive Müller Cells.**

*Investigative Ophthalmology & Visual Science*



# Retinal Degeneration Triggers the Activation of YAP/TEAD in Reactive Müller Cells

Annaïg Hamon,<sup>1,2</sup> Christel Masson,<sup>1,2</sup> Juliette Bitard,<sup>1,2</sup> Linn Gieser,<sup>3</sup> Jérôme E. Roger,<sup>1,2</sup> and Muriel Perron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Paris-Saclay Institute of Neuroscience, CNRS, Univ Paris-Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France

<sup>2</sup>Centre d'Etude et de Recherche Thérapeutique en Ophtalmologie, Retina France, Orsay, France

<sup>3</sup>Neurobiology-Neurodegeneration & Repair Laboratory, National Eye Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States

Correspondence: Muriel Perron, Bat. 445, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France;

muriel.perron@u-psud.fr.

Jérôme E. Roger, Bat. 445, Université Paris-Sud, 91405 Orsay Cedex, France;

jerome.roger@u-psud.fr.

AH and CM are joint first authors.

Submitted: December 23, 2016

Accepted: March 2, 2017

Citation: Hamon A, Masson C, Bitard J, Gieser L, Roger JE, Perron M. Retinal degeneration triggers the activation of YAP/TEAD in reactive Müller cells.

*Invest Ophthalmol Vis Sci.*

2017;58:1941–1953. DOI:10.1167/iovs.16-21366

**PURPOSE.** During retinal degeneration, Müller glia cells respond to photoreceptor loss by undergoing reactive gliosis, with both detrimental and beneficial effects. Increasing our knowledge of the complex molecular response of Müller cells to retinal degeneration is thus essential for the development of new therapeutic strategies. The purpose of this work was to identify new factors involved in Müller cell response to photoreceptor cell death.

**METHODS.** Whole transcriptome sequencing was performed from wild-type and degenerating *rd10* mouse retinas at P30. The changes in mRNA abundance for several differentially expressed genes were assessed by quantitative RT-PCR (RT-qPCR). Protein expression level and retinal cellular localization were determined by western blot and immunohistochemistry, respectively.

**RESULTS.** Pathway-level analysis from whole transcriptomic data revealed the Hippo/YAP pathway as one of the main signaling pathways altered in response to photoreceptor degeneration in *rd10* retinas. We found that downstream effectors of this pathway, YAP and TEAD1, are specifically expressed in Müller cells and that their expression, at both the mRNA and protein levels, is increased in *rd10* reactive Müller glia after the onset of photoreceptor degeneration. The expression of *Ctgf* and *Cyr61*, two target genes of the transcriptional YAP/TEAD complex, is also upregulated following photoreceptor loss.

**CONCLUSIONS.** This work reveals for the first time that YAP and TEAD1, key downstream effectors of the Hippo pathway, are specifically expressed in Müller cells. We also uncovered a deregulation of the expression and activity of Hippo/YAP pathway components in reactive Müller cells under pathologic conditions.

**Keywords:** retina, Müller cells, Hippo/YAP pathway, photoreceptor degeneration

Müller cells are the major glial cell type of the vertebrate retina. Their cell body lies in the inner nuclear layer (INL) of the neural retina while their processes span the entire thickness of the tissue. Under normal conditions, Müller cells actively participate in the maintenance of retinal functions and homeostasis. In addition to their structural role, they release neurotrophic factors, regulate oxidative stress, form the retinal blood barrier, and participate in retinal synaptic activity by recycling neurotransmitters.<sup>1,2</sup> Due to their important role, dysfunction or absence of Müller cells lead to retinal structure disorganization and loss of photoreceptor function.<sup>3,4</sup> In response to pathologic conditions, these glial cells enter a state referred to as reactive gliosis with both detrimental and beneficial effects.<sup>5,6</sup> Among the latter is neuroprotection via the increased release of neurotrophic and antioxidant factors.<sup>5,7</sup> In addition, and under certain conditions, reactive Müller cells can dedifferentiate into cells displaying characteristics of retinal stem cells, proliferate and generate neurons.<sup>8,9</sup> If such a process is very efficient in fish, it is however largely ineffective in mammals.<sup>10–12</sup> Hence, increasing our knowledge of the molecular mechanisms underlying Müller cell function under normal and pathologic conditions is essential for developing

new therapeutic strategies that take advantage of their neuroprotective and regenerative properties.

In various species, a large variety of pathways have been shown to influence Müller cell activation in response to retinal injury, including MAPK, Wnt, Notch, Hedgehog, glucocorticoid, Jak/Stat, TGFβ/Smad, or mTor.<sup>9,13</sup> The Hippo/Yes-associated protein (YAP) signaling pathway is another key pathway that has recently brought a lot of interest as an important regulator of tissue homeostasis through its action on both cell proliferation and survival.<sup>14,15</sup> So far, its participation in Müller cell reactivation has not been investigated.

The Hippo pathway regulates diverse biological processes including proliferation, differentiation, survival, and is conserved throughout evolution.<sup>16,17</sup> The core of the Hippo pathway consists of a kinase cascade that phosphorylates the transcription coactivators, YAP and its homolog TAZ, at a specific serine residue of the amino-terminal region, leading to their sequestration within the cytoplasm. The Hippo pathway is regulated in response to diverse stimuli such as mechanical stress, DNA damage, or oxidative stress.<sup>15,18</sup> When the pathway is off, YAP and TAZ translocate into the nucleus and interact with their DNA-binding partners of the TEAD (TEA domain



transcription factor) family, driving gene regulatory networks involved in cell proliferation and differentiation.<sup>19</sup> In the adult, the effector of the pathway, YAP, can stimulate regeneration of several injured mammalian organs such as the heart, liver, intestine<sup>20–22</sup> or the tail and limb in *Xenopus*.<sup>23,24</sup> Its function in the adult retina and in particular in Müller cells has hitherto not been investigated. On the other hand, studies in various species have implicated YAP in retinal development. In zebrafish, YAP controls the balance between proliferation and differentiation of retinal progenitors<sup>25,26</sup> and is a key regulator of retinal pigment epithelium (RPE) genesis.<sup>27</sup> In *Xenopus* tadpoles, YAP is required in retinal stem cells for postembryonic retinal growth.<sup>28</sup> Yes-associated protein also positively regulates proliferation of mammalian retinal progenitors.<sup>29</sup> Noteworthy, heterozygous YAP loss-of-function mutations in humans can result in autosomal dominant coloboma,<sup>30</sup> and a mutation within the YAP-binding domain of TEAD1<sup>31</sup> causes Sveinsson's chorioretinal atrophy (SCRA), an autosomal dominant eye disease characterized by chorioretinal degeneration.<sup>32</sup> However, the mechanisms underlying YAP/TEAD function in these diseases are so far unknown.

Meta-analysis using already published ChIP-Seq data,<sup>33</sup> and whole transcriptome sequencing data (RNA-Seq) from retinas of the well-characterized degenerative mouse model of retinitis pigmentosa, *rd10*, led to the identification of a set of INL-enriched genes. Pathway-level analysis revealed the Hippo pathway as one of the main deregulated pathways. We thus undertook a detailed analysis of the expression of YAP and its potential partner TEAD1 in normal adult retina and during photoreceptor degeneration. We found that both are specifically expressed in Müller cells. Their expression, as well as that of their well-characterized direct target genes, *Ctgf* and *Cyr61*, is increased alongside photoreceptor loss. Thus, this work uncovers for the first time a link between the Hippo/YAP pathway and Müller cell reactivation in pathologic conditions.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals and Tissues

All mice were handled in compliance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. C57BL6/J (Charles River, L'Arbresle, France) and *rd10* mice (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA, kindly provided by Bo Chang) were kept at 21°C, under a 12-hour light/12-hour dark cycle, with food and water supplied ad libitum. For the chemical-induced retinal degeneration model, C57BL6/J adult mice were given a single intraperitoneal injection of 1-Methyl-1-nitrosourea (MNU) at a dose of 60 mg/kg body weight. The MNU solution (Ark Pharm, Libertyville, IL, USA) was freshly dissolved in sterile physiological saline immediately before use. Control animals received physiological saline.

After mouse euthanasia, the eyes were rapidly enucleated and processed for immunohistochemistry, western blot, RNA-Seq, and quantitative RT-PCR (RT-qPCR) as described in the following sections.

### Whole Transcriptome Sequencing (RNA-Seq) and Data Analysis

Whole transcriptome analysis was performed on three independent biological replicates from wild-type (WT) and *rd10* retina at postnatal stage 30 (P30). After harvesting, both retinas for each animal were collected and immediately frozen. RNA was extracted using Nucleospin RNA Plus kit, which includes DNase treatment (Macherey-Nagel, Düren, Germany). RNA quality and quantity were evaluated using a BioAnalyzer

2100 with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Stranded RNA-Seq libraries were constructed from 100 ng of high quality total RNA (RIN > 8) using the TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Paired-end sequencing of 125 bases length was performed on a HiSeq 2500 system (Illumina). Pass-filtered reads were mapped using TopHat version 2.1.0 and aligned to UCSC mouse reference genome mm10.<sup>34</sup> Count table of the gene features was obtained using HT-Seq.<sup>35</sup> Normalization, differential expression analysis, and fragments per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM) values were computed using EdgeR.<sup>36</sup> An FPKM filtering cutoff of two in at least one of the six samples was applied. A *P* value of less than or equal to 0.05 was considered significant, and a cutoff of a fold change (FC) of 1.2 was applied to identify differentially expressed isoforms. Pathways analysis was done using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) and GO annotation obtained using DAVID Bioinformatics Resources 6.7.

### RNA Extraction and Gene Expression Analysis by Real-Time PCR

Quantitative RT-PCR experiment was performed on two independent biological replicates from WT and *rd10* retinas at each stage (P10, P20, P30, and P120). Each sample was a pool of retinas from at least three individuals. Total RNA was extracted from neural retina using RNeasy mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) and treated with DNase I according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality were assessed using the NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Experion automated electrophoresis system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). One microgram of total RNA was reverse transcribed in the presence of oligo-(dT)20 using Superscript II reagents (Thermo Fisher Scientific). For each RT-qPCR, 2 µL of a 10-fold dilution of the cDNA was used, and the reactions were performed in triplicates on a 7900HT Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) as previously described.<sup>37</sup> Differential expression analysis was performed using the  $\Delta\Delta C_t$  method using the geometric average of *Gak*, *Mrpl46*, *Srp72*, and *Tbp* as the endogenous controls.<sup>38</sup> For each gene, the relative expression of each samples was calculated using WT retina at each time point as the reference (1 arbitrary unit [a.u.]). Primers are listed in Supplementary Table S1.

### Western Blotting

Western blot was performed on retina pools of at least three individuals unless otherwise specified in the figure legends. Eyes were removed and retinas were quickly isolated and frozen at -80°. Retinas were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate) and protease inhibitor cocktail (P-2714; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Lysates concentration was determined using a Lowry protein assay kit (500011, DC Protein Assay; Bio-Rad). Equal amounts of proteins (20 µg of each sample) were loaded, separated by 7.5% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were then conducted using standard procedures. Primary and secondary antibodies are listed in Supplementary Table S2. An enhanced chemiluminescence kit (Bio-Rad) was used to detect the proteins. Each sample was probed once with tubulin for normalization.  $\alpha$ -tubulin was used as the loading control for each sample. Quantification was done using ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>; provided in the public domain by the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Acrylamide gels containing Phos-tag (40  $\mu$ M final; SOBIODA, Montbonnot-Saint-Martin, France) were prepared according to the manufacturer's instructions. Immunoblotting was then performed according our standard protocol. As a control, and to allow discrimination between phosphorylated and non-phosphorylated forms of YAP, one *rd10* P10 lysate was treated with 10 U of calf intestinal alkaline phosphatase (Thermo Fisher Scientific) for 1 hour at 37°C and processed thereafter for western blot as previously described.

### Immunohistochemistry

Standard immunohistochemistry techniques on paraffin sections were applied with the following specificities: antigen unmasking treatment was done in boiling heat-mediated antigen retrieval buffer (10 mM sodium citrate, pH 6.0) twice for 20 minutes. Primary antibody was diluted in ready-to-use diluent (S0809, Dako, Glostrup, Denmark). The specificity of the anti-YAP and anti-TEAD1 antibodies has already been shown by other groups.<sup>39,40</sup> Primary and secondary antibodies are listed in Supplementary Table S2. Sections were counterstained with 1:1000 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 mg/mL, 62248, Thermo Fisher Scientific).

### Confocal Microscopy

Confocal images were acquired using a Zeiss LSM710 confocal microscope and Zen software (Zeiss, Thornwood, NY, USA). Images were taken near the optic nerve. The same magnification, laser intensity, gain, and offset settings were used across animals for any given marker. All experiments were done in triplicate. Image processing was performed using ImageJ software (National Institutes of Health).

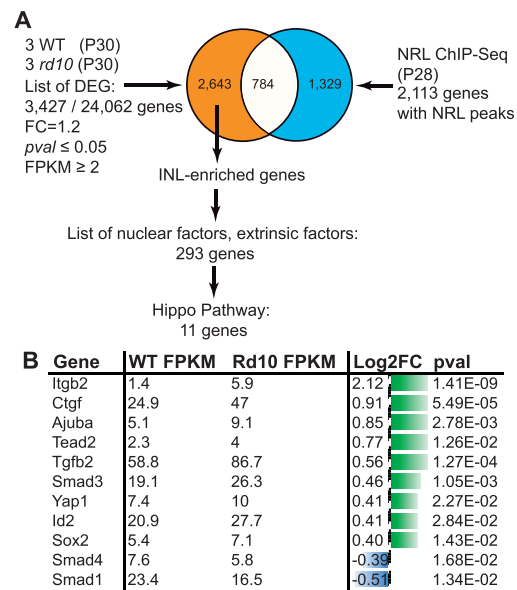
### Statistical Analysis

Results are reported as mean  $\pm$  SEM. Nonparametric Mann-Whitney *U* test was used to analyze western blot data. *P* value  $\leq$  0.05 was considered significant.

## RESULTS

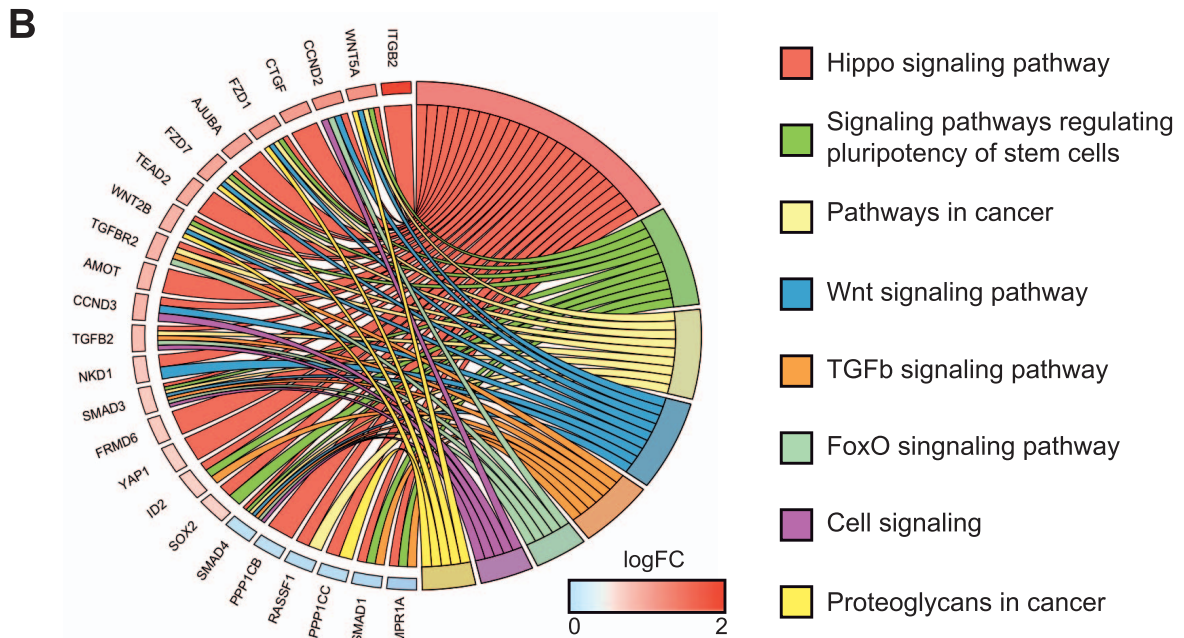
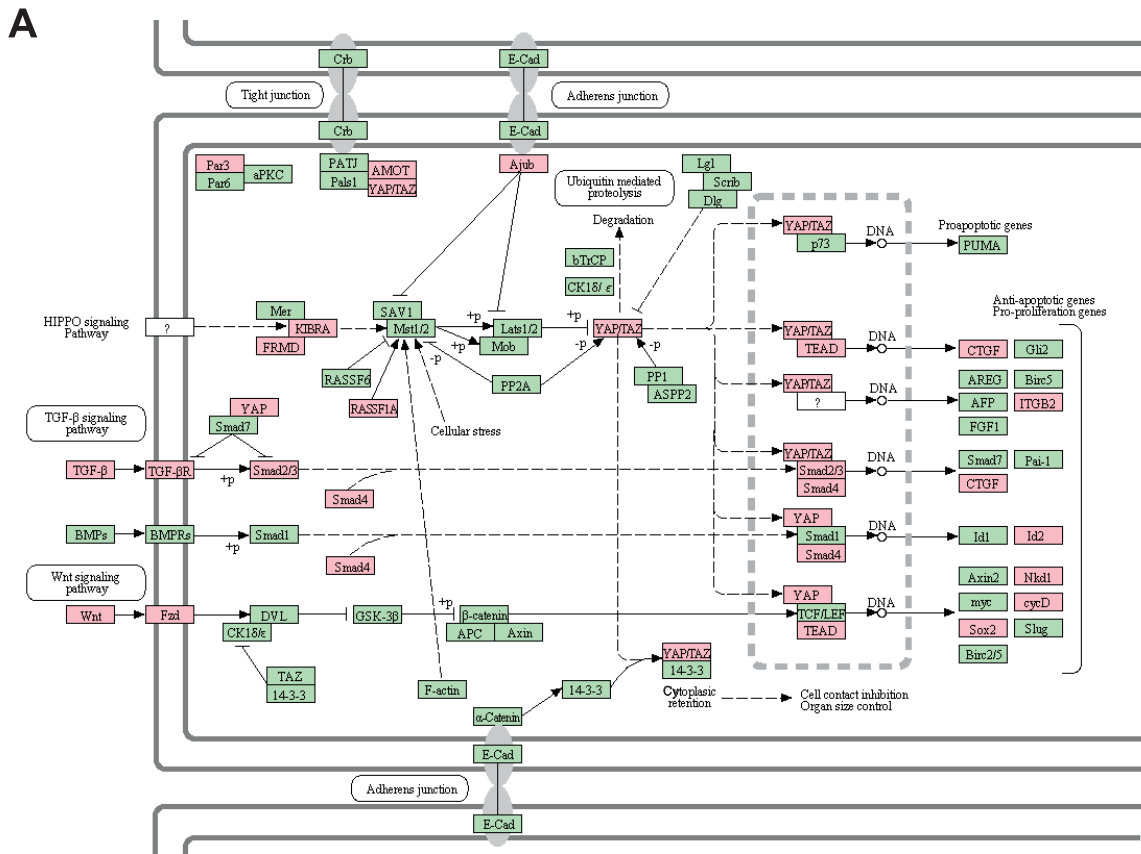
### The Hippo Pathway Is One of the Main Pathways Altered in Response to Photoreceptor Degeneration

To gain insights into the molecular mechanisms triggered in Müller cells following photoreceptor cell death, we performed whole transcriptome sequencing of *rd10* mouse retinas (*Pde6b<sup>rd10</sup>*), and used C57Bl6/J WT mice as controls. In *rd10* mice, degeneration is due to a mutation in the  $\beta$  subunit of the rod phosphodiesterase gene (*Pde6b*).<sup>41,42</sup> In humans, mutations in the same gene cause retinitis pigmentosa.<sup>43</sup> In *rd10* mice, rod cell death starts around P16, and the vast majority of photoreceptors are lost by P60.<sup>41</sup> We decided to perform RNA-Seq experiments on P30 retina in order to investigate the molecular response of Müller cells. By choosing this time point, we speculated that Müller cell response to injury would still be active since rod photoreceptor cell death is still occurring in contrast to a previous study performed at much later time points when all rods are already lost.<sup>44</sup> Gene level analysis of the sequencing data allowed the identification of 3427 differentially expressed genes (DEGs) out of 24,062 genes using criteria of FC 1.2 with a *P* value cutoff of 0.05 and a minimum expression of two FPKMs in at least one sample (Fig. 1A). Such relaxed parameters allow the identification of several genes with small FC, which may be of importance if they are all

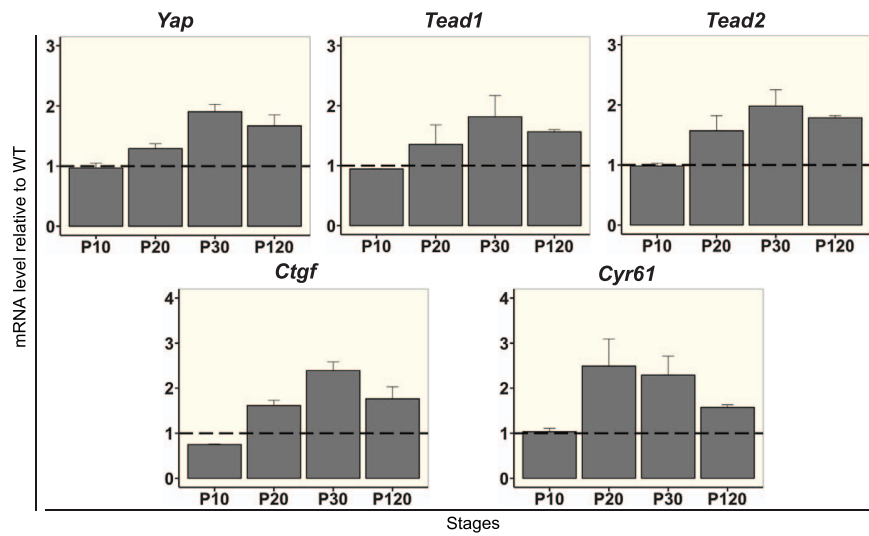


**FIGURE 1.** Identification of nuclear and extrinsic factors differentially expressed between *rd10* and WT P30 retina. **(A)** Workflow of the meta-analysis used to identify nuclear and extrinsic factors differentially expressed in the degenerative *rd10* retina at P30. **(B)** Table of the 11 nuclear and extrinsic factors differentially expressed and related to the Hippo pathway. Gene expression values in WT and *rd10* are expressed in FPKM. Log2 of the FC and *P* value are also indicated. Green bars, upregulated genes; blue bars, downregulated genes. The length of the bar is proportional to the log2 of the FPKM value.

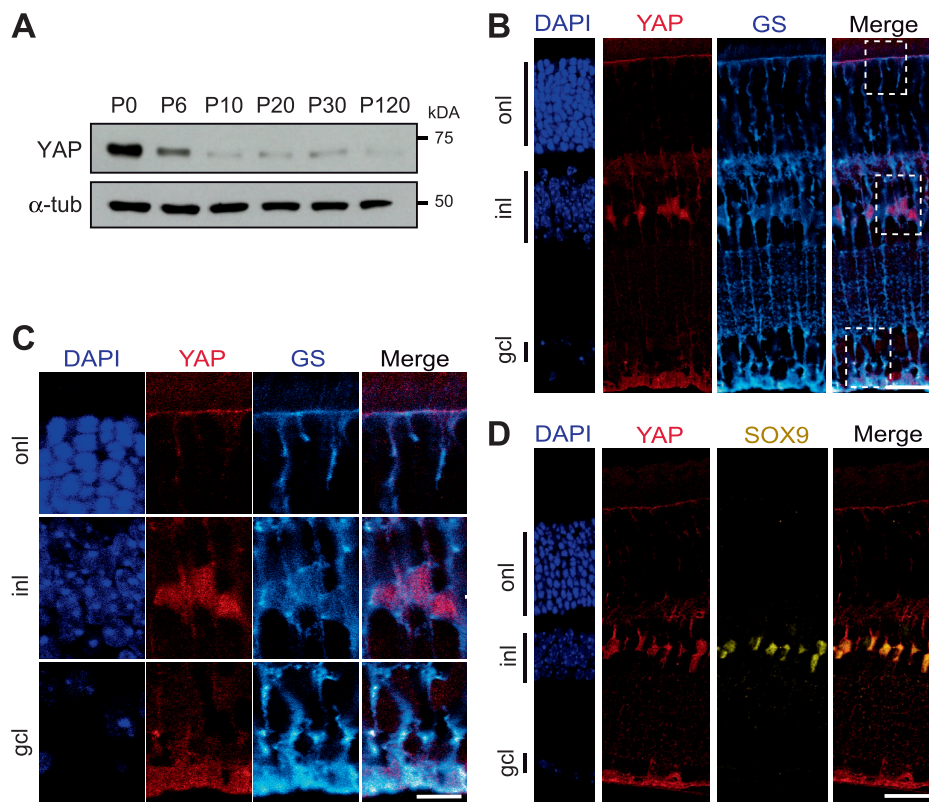
part of the same pathway. With this objective in mind, the next step was the enrichment of the dataset with genes mostly expressed in the inner retina, where Müller cells are located. Therefore, we used neural retina leucine zipper (NRL) ChIP-Seq data to filter out photoreceptor-NRL target genes.<sup>53</sup> Indeed, NRL is a rod-specific transcription factor required for rod photoreceptor development and homeostasis and is specifically expressed in photoreceptors.<sup>45</sup> Putative photoreceptor-specific transcripts, as defined by at least one binding site for NRL, were discarded from our dataset, leading to 2643 DEGs named thereafter INL-enriched genes. Although among them, some are photoreceptor-expressed genes without NRL binding sites, such an approach circumvents the identification of a large number of genes expressed in rods and identified as downregulated due to photoreceptor cell death. In addition, based on PANTHER annotation, we kept only extrinsic factors and nuclear factors for further pathway analysis, which represent two of the main categories of signaling pathway regulators (extrinsic cues and effectors, respectively). This approach led to the identification of 293 DEGs that were then used for pathway analysis using KEGG (Fig. 1A). Among the top pathways, several were already known as deregulated during retinal degeneration such as PI3K-Akt signaling, Jak-STAT, and cytokine-related pathways (Supplementary Table S3). More interestingly, this analysis of the 293 DEGs belonging to extrinsic factors and nuclear factors categories revealed the Hippo pathway as a new signaling pathway deregulated in degenerative retina. Indeed, KEGG pathway analysis revealed a total of 11 Hippo signaling related genes as significantly differentially expressed in *rd10* versus WT mouse retina (Fig. 1B) with nine of them upregulated and two downregulated. We then extended our analysis to our entire dataset of 2643 DEGs (regardless of the PANTHER annotation). Among genes identified in the KEGG database as related to the Hippo pathway, 25 were differentially expressed (Fig. 2A). Chord plot



**FIGURE 2.** Identification of 25 DEGs between *rd10* and WT P30 retina related to the Hippo pathway and at the crossroad of other signaling pathways. **(A)** Schematic of the Hippo pathway from KEGG. *Red boxes* indicate 25 genes found differentially expressed in our dataset. *Green boxes* indicate unchanged genes. **(B)** ChordPlot representation shows the relationship between these 25 Hippo signaling components that are differentially expressed in *rd10* retina, and other KEGG signaling pathways.

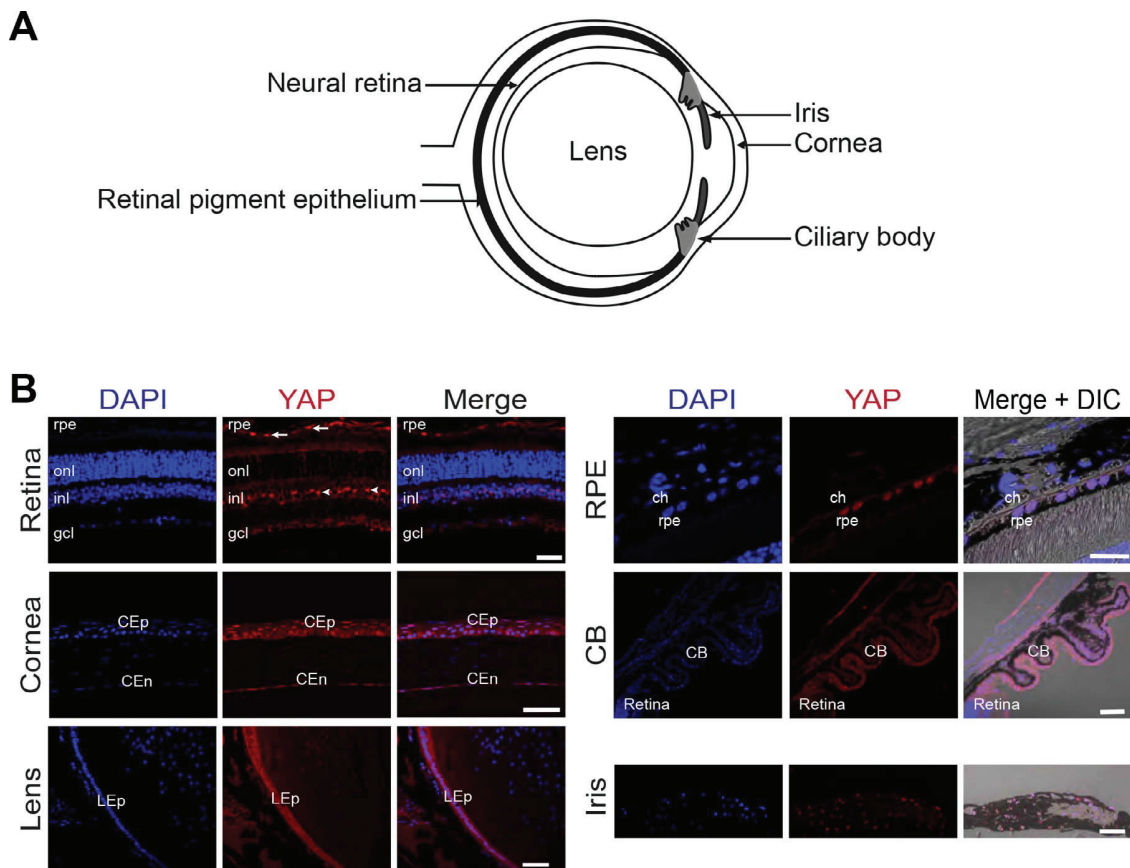


**FIGURE 3.** RT-qPCR validation of selected Hippo pathway components identified by RNA-seq analysis during retinal degeneration. Differential expression analysis by RT-qPCR of *Yap*, *Tead1*, *Tead2*, *Ctgf*, and *Cyr61* in *rd10* retina at various stages as indicated, relative to WT levels. All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM from two biological replicates. The data were normalized against the geometric average  $\Delta$ Ct of four housekeeping genes: *Gak*, *Mrpl46*, *Srp72*, and *Tbp*.



**FIGURE 4.** YAP expression in Müller cells. (A) Representative western blots of retinal protein extracts from WT mice at different stages from P0 to P120 probed with anti-YAP antibody or anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) as a loading control. (B) Coimmunostaining with anti-YAP antibody (red) and anti-GS (cyan) antibody, on adult (P60) mouse retinal section. Nuclei are labeled with DAPI (blue). (C) Enlargement of framed areas (dashed lines) showing YAP expression in Müller cell microvilli (in the onl), nuclei (in the inl) and endfeet (in the gcl). (D) Colocalization of YAP immunostaining (red) with SOX9 (yellow). onl, outer nuclear layer; gcl, ganglion cell layer. Scale bars: 20  $\mu$ m in B, D, and 10  $\mu$ m in C.





**FIGURE 5.** YAP expression in the adult mouse eye. (A) Schematic of a transverse section of an adult mouse eye, pointing to the different areas imaged in B. (B) Immunostaining with anti-YAP antibody (red) on adult (P60) eye sections. Different ocular regions are shown as indicated. Nuclei are DAPI counterstained (blue). Merge images plus phase contrast (DIC) are shown in the case of pigmented structures. YAP staining is detected in scattered cells within the INL and in the RPE but not in choroidal melanocytes (ch). YAP is also expressed in corneal epithelial (CEp) and corneal endothelial cells (CEd), in lens epithelial cells (LEp), in the ciliary body (CB), and the iris. onl, outer nuclear layer; gcl, ganglion cell layer. Scale bars: 50  $\mu$ m except for RPE and iris where it is 20  $\mu$ m.

representation illustrates the relationship between those and other signaling pathways such as Wnt or TGF $\beta$  (Fig. 2B).

### The Transcriptional YAP/TEAD Complex Is Upregulated in Response to Photoreceptor Degeneration

We then used RT-qPCR at P30 to validate some of our transcriptomic analysis findings. We also extended the study by analyzing gene expression at different stages (P10: before the degeneration; P20: after the onset of the degeneration; P30: stage corresponding to the transcriptomic analysis; P120: late onset of the degeneration when all rod photoreceptors are lost). We first focused on the terminal effector of the pathway, YAP. If *Yap* expression is not affected at P10 prior to degeneration, an increased expression in *rd10* compared to WT was observed from P20 onwards (Fig. 3).

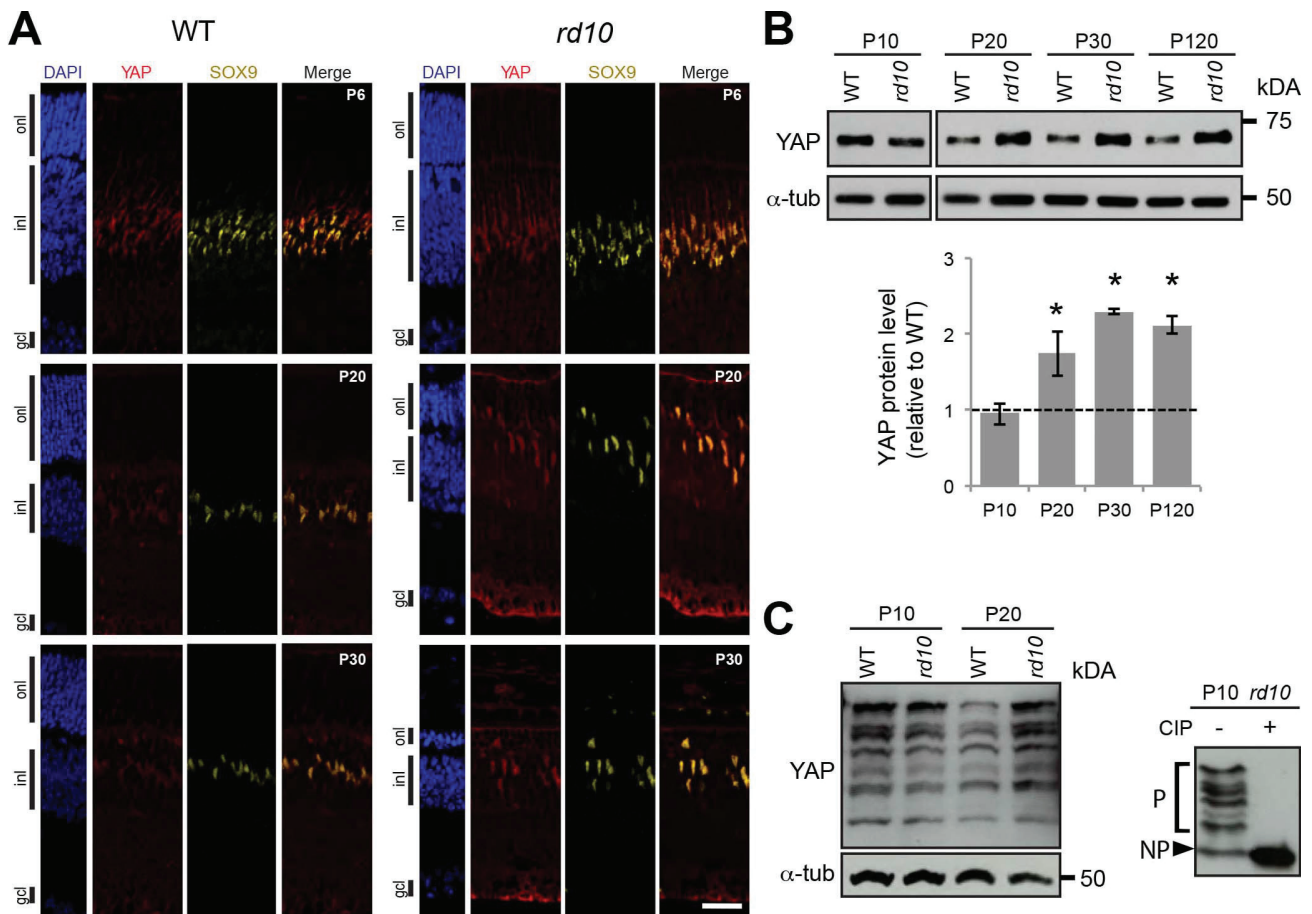
As a cofactor, YAP mediates its transcriptional activity mainly by its association with TEAD transcription factors.<sup>46</sup> We thus also focused our analysis on members of this gene family. Among the four members, only *Tead2* was identified as differentially expressed in the RNA-Seq analysis and validated by RT-qPCR analysis (Fig. 3). Although RNA-Seq analysis did not show any significant difference in the expression of *Tead1*, RT-qPCR showed that it was also upregulated in *rd10* retina (Fig. 3). The other two members of the *Tead* family (i.e., *Tead3* and

*Tead4*) were considered not expressed in mouse retinas (FPKM < 1 by RNA-Seq and not detected by RT-qPCR).

*Ctgf* has been recognized as a direct YAP/TEAD target gene<sup>46</sup> and identified as a DEG in our RNA-Seq analysis (Fig. 1B). We confirmed by RT-qPCR that *Ctgf* is differentially expressed following photoreceptor death in *rd10* mouse versus WT (Fig. 3). Although *Cyr61* is another bona fide YAP/TEAD target gene,<sup>47</sup> it is not listed in the KEGG database on which our pathway analysis is based. Nevertheless, both our RNA-Seq and RT-qPCR analysis revealed a significant upregulation of *Cyr61* in *rd10* retina compared to WT (Fig. 3).

To support these conclusions in another model of retinal degeneration, we investigated the expression of these genes in the *rd1* mouse model. The *rd1* mouse line is another well-characterized model of retinitis pigmentosa caused by a mutation in the *Pde6b* gene.<sup>48</sup> In *rd1* animals, rod photoreceptors begin to degenerate at approximately P10. Microarray analysis retrieved from the KBaSS database (Knowledge Base for Sensory Systems: [kbass.institut-vision.org/KBaSS](http://kbass.institut-vision.org/KBaSS))<sup>49</sup> revealed an increased expression of *Yap*, *Ctgf*, and *Cyr61*, after the onset of the degeneration process from P13 onwards (Supplementary Fig. S1). We did not assess *Tead* family gene expression since the database did not give any signal level information for *Tead* probes.

Altogether, these data revealed an upregulation of key Hippo signaling factors during photoreceptor cell loss.



**FIGURE 6.** YAP expression during retinal degeneration. (A) Coimmunostaining with anti-YAP (red) and anti-SOX9 (yellow) antibodies on retinal sections of WT and *rd10* mice at different stages from P6 to P30. Nuclei are DAPI counterstained (blue). (B) Representative western blots of retinal protein extracts from WT and *rd10* mice at different stages from P10 to P120, probed with anti-YAP antibody or anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) as a loading control. Histogram representation of YAP quantification from western blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin and relative to WT at each stage (dashed line). Mean values  $\pm$  SEM from four independent western blot experiments are shown. Asterisk indicates  $P$  value  $\leq 0.05$  (Mann-Whitney  $U$  test). (C) Representative western blots of retinal protein extracts from WT and *rd10* mice at P10 and P20 using Phos-tag gel and probed with anti-YAP antibody or anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub; left panel). The shifted bands correspond to YAP phosphorylated isoforms since they are lost following Calf intestinal alkaline phosphatase (+CIP) treatment on *rd10* P10 lysate (right panel). P, phosphorylated forms of YAP; NP, nonphosphorylated form of YAP; onl, outer nuclear layer; gcl, ganglion cell layer. Scale bars: 20  $\mu$ m.

### YAP Expression in Müller Cells

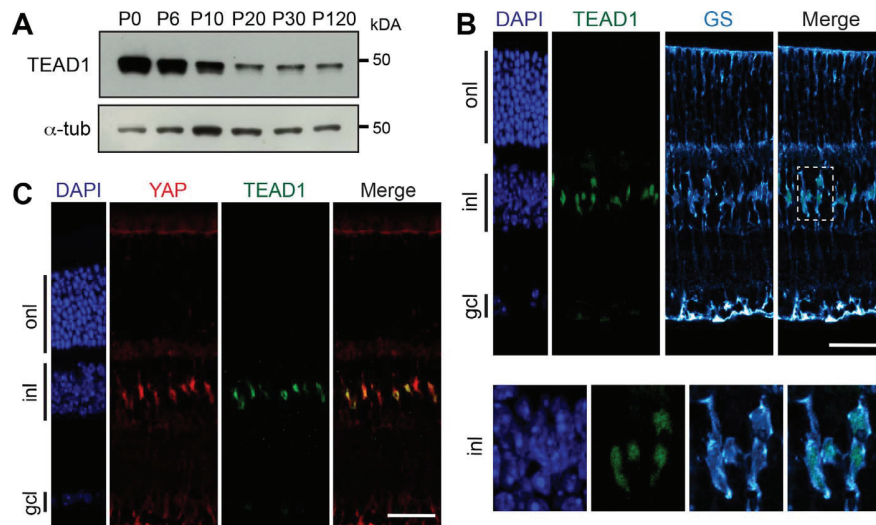
The finding that Hippo signaling effectors are upregulated at the transcriptional level in the INL of the degenerative retina prompted us to determine in which cells YAP is expressed in the adult retina, and if the upregulation could also be detected at the protein level. Western blot analysis was performed to evaluate the total amount of YAP protein in the retina at various postnatal time points from P0 to adult (Fig. 4A). A 65-kDa band corresponding to the predicted molecular weight of YAP was detected. As previously reported, a large amount of YAP protein was found in P0 retina, when retinal progenitors are still proliferating.<sup>29</sup> Thereafter, the signal intensity strongly decreases up to P10, when all cells are postmitotic, and then remains at a steady-state level up to adulthood. To identify retinal cell types expressing YAP, we performed immunostaining on retinal sections of P60 WT mice. Although YAP is mostly known for being expressed in proliferative cells during development, we found YAP-positive cells in the INL, where postmitotic retinal cells reside. The presence of aligned and scattered labeled cells in the INL was already reported by our team in the *Xenopus* retina.<sup>28</sup> Their position in this layer

strongly suggests that YAP could be specifically expressed in Müller glial cells. This hypothesis was supported by our double staining analysis with anti-YAP and antiglutamine synthetase (GS, a Müller cell specific marker; Fig. 4B).<sup>50</sup> Staining is detected in the nuclei as well as in the microvilli and the endfeet (Fig. 4C). The Müller cell specific expression was also confirmed by a colabeling with a nuclear marker of Müller cells, SOX9 (Fig. 4D).<sup>51</sup> All YAP-positive cells were colabeled, demonstrating their Müller cell identity.

Of note, YAP immunolabeling was also detected in several nonneural ocular tissues, including the RPE, the cornea, the lens, the ciliary body, and the iris (Fig. 5). Expressed sequence tags (ESTs) retrieval from the BioGPS website supports this expression analysis.

### YAP Expression in Müller Cells During Retinal Degeneration

We next investigated whether the upregulation of *Yap* gene expression observed in our RNA-Seq and RT-qPCR analysis was also impacting YAP protein level and whether it was restricted in the retina to Müller glia cells. To address these questions, we



**FIGURE 7.** TEAD1 expression in Müller cells. **(A)** Representative western blots of retinal protein extracts from WT mice at different stages from P0 to P120, probed with anti-TEAD1 antibody or anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) as a loading control. **(B)** Coimmunostaining with anti-TEAD1 (green) and anti-GS (cyan) on adult mouse (P60) retinal section. Nuclei are DAPI counterstained (blue). The framed area (dashed line) is enlarged showing TEAD1 expression in GS-labeled nuclei. **(C)** Coimmunostaining with anti-YAP (red) and anti-TEAD1 (green) antibodies on adult mouse retinal section. Nuclei are DAPI counterstained (blue). onl, outer nuclear layer; gcl, ganglion cell layer. Scale bars: 20  $\mu$ m.

performed immunostaining analysis and compared YAP expression in *rd10* and WT mouse retina at different stages of photoreceptor degeneration (Fig. 6A). At P6, before the onset of photoreceptor cell death, YAP staining in Müller cells (SOX9-positive cells) was similar in *rd10* and WT retinas (Fig. 6A). In contrast, we observed a stronger YAP staining intensity at P20 and P30 in the cytoplasm and the nucleus of Müller cells in *rd10* retina compared to WT. This increase of YAP protein level correlates with a gliotic state of Müller cells, as inferred by immunostaining for GFAP, the gold standard marker of reactive gliosis (Supplementary Fig. S2).<sup>52</sup> The increase in YAP protein levels in *rd10* versus WT retina after the onset of retinal degeneration was strengthened by western blot analysis (Fig. 6B). A higher YAP protein level was maintained even after all photoreceptors died at P120.

We wondered whether the protein level of YAP could be artificially increased because of the relative enrichment in inner retinal cells that occurs as photoreceptors die off in *rd10* mice.  $\alpha$ -tubulin may indeed not be a good reference protein if expressed in the entire retina. However, by immunostaining, we found that  $\alpha$ -tubulin is mostly expressed in the INL/inner plexiform layer (IPL) and faintly in the photoreceptor layer (Supplementary Fig. S3), proving the pertinence of using this protein as a control, as previously shown for  $\beta$ -tubulin.<sup>53</sup> To definitely assess the validity of our quantification approach, we also normalized YAP level with two INL-specific proteins, calbindin-D-28K (a marker of bipolar cells) and PKC $\alpha$  (a marker of horizontal cells). As with  $\alpha$ -tubulin normalization, we found using these two markers as loading controls that YAP protein level in the retina is also significantly increased in *rd10* compare to WT retinas (Supplementary Fig. S3).

Posttranslational modifications have been shown to play a critical role in the regulation of YAP activity. For instance, phosphorylation events by the Hippo pathway result in YAP cytoplasmic localization (cytoplasmic retention or poly-ubiquitination and degradation).<sup>19</sup> To determine whether the upregulation of YAP in reactive Müller cells is associated with changes in its phosphorylation status, we performed Phos-tag-based western blots (Fig. 6C). This method allows greater separation of phosphorylated and nonphosphorylated protein and facilitates analysis at the isoform level.<sup>54</sup> The efficiency of

the method was validated following a phosphatase treatment. As expected in such conditions, only one form of non-phosphorylated YAP was detected while multiple bands are present in the control, reflecting various levels of phosphorylation. We observed that phosphorylated as well as non-phosphorylated forms of YAP are all increased at P20 in *rd10* retina compared to WT retina. These data suggest that YAP phosphorylation overall profile is not markedly affected in reactive Müller cells.

In order to assess whether the increase in YAP expression also occurs in another degenerative context, we used the MNU-induced model, which is known to cause photoreceptor degeneration and reactive gliosis.<sup>55</sup> In this model, we observed an increased level of YAP expression 72 hours after MNU injection, by both immunostaining and western blot analysis (Supplementary Fig. S4).

Altogether, using both a genetic and a chemical model of retinal degeneration, our results indicate that YAP level increases in reactive Müller cells upon photoreceptor degeneration.

### TEAD1 Expression in Müller Cells During Retinal Degeneration

We next asked whether TEAD proteins were also expressed in adult Müller cells. By western blot, we observed that the level of TEAD1 protein in the retina decreases after P6, but that a band remains detectable at a roughly steady-state level from P10 to P120 (Fig. 7A), as previously shown for YAP (Fig. 4A). TEAD1 protein expression was restricted to Müller cells in adult retina, as demonstrated by coimmunostaining with GS antibody (Fig. 7B). We also confirmed that YAP and TEAD1 are coexpressed in Müller cell nuclei (Fig. 7C).

In order to assess whether TEAD1 protein level was affected in reactive Müller cells, we performed western blot and immunostaining analysis and compared TEAD1 expression levels between *rd10* and WT retina. Similar to what was observed for YAP, we found that TEAD1 level was equivalent in *rd10* and WT retina at P10 but was clearly upregulated in reactive Müller cells after the onset of photoreceptor degeneration (Figs. 8A, 8B). Similarly, in MNU-induced retinal



and the already described function of YAP in stem cells and regeneration, it is tempting to speculate that YAP may contribute to provide some stem-like characteristics to these glial cells. Indeed, the Hippo pathway has been proposed to act in numerous types of stem cells in a variety of organisms.<sup>63–65</sup> YAP in particular was found enriched in multiple mouse stem and progenitor cells, including embryonic stem cells (ESCs).<sup>66</sup> YAP overexpression was reported to regulate mouse ESCs self-renewal, to increase the efficiency of mouse induced pluripotent stem cells (iPS) generation, and more recently to promote the generation of naive human pluripotent stem cells.<sup>67–69</sup> YAP also regulates the proliferation of stem and progenitor cells in a variety of organs including the intestine, liver, skin, retina, and brain<sup>28,70–72</sup> and is involved in adult tissue repair and regeneration.<sup>20–22,73–75</sup> Whether YAP could induce regenerative activity in Müller cells remains, however, to be investigated in species with regenerative properties such as zebrafish.

We found that the Hippo pathway, typically associated with growth control, is deregulated in a degenerating retina despite the absence of active proliferation. This might actually not be so surprising as Hippo signaling also emerged as a cellular stress response, important for maintaining cell and tissue homeostasis.<sup>15</sup> What triggers the upregulation of multiple components of the pathway, in particular YAP/TEAD complex, following photoreceptor cell death? Several studies in mammalian cells revealed that YAP expression and subcellular distribution are regulated by mechanical cues, such as the stiffness of the extracellular matrix.<sup>76–79</sup> For instance, substrate stiffness was shown to modulate the expression of YAP in human trabecular meshwork cells, known to stiffen in patients with glaucoma.<sup>80</sup> Rearrangement of the cytoskeleton following photoreceptor loss in the retina may thus trigger, at least in part, the changes in YAP expression that we observed in Müller cells in both *rd10* and MNU models.

Multiple lines of evidence also linked the Hippo pathway with oxidative stress.<sup>15,81,82</sup> It is, however, difficult to draw a clear conclusion as studies on the effects of accumulated reactive oxygen species (ROS) on Hippo signaling are conflicting.<sup>81,83</sup> Whether ROS in the degenerative retina is part of the triggering signal leading to Hippo pathway gene expression modulation is an attractive hypothesis that remains to be investigated.

Another related question is whether YAP increase in reactive Müller cells could mediate a cellular defense against oxidative stress. Indeed, several studies revealed that YAP has the ability to promote the expression of genes encoding proteins with antioxidant properties, resulting in decreased cellular ROS.<sup>20,84,85</sup> In *Drosophila*, Hippo signaling has also recently been implicated in the transduction of cellular survival signals in response to chemical stress.<sup>86</sup> Along this line, the secreted protein CYR61, a well-known direct target of YAP, which we found upregulated in reactive Müller cells, has recently been identified as a neuroprotective agent in organotypic retinal cultures of a mouse model of retinitis pigmentosa.<sup>87</sup> It would thus be interesting to assess whether *Cyr61* is a direct target of YAP in the retina, and thus whether *Cyr61* upregulation in the *rd10* model is a direct consequence of YAP upregulation. The aim would then be to investigate in vivo whether such YAP-Cyr61 axis in Müller cells has neuroprotective capacities in a degenerating retina. Regarding the other well-known YAP target gene *Ctgf*, it has been detected in the retina and was shown to be expressed by Müller cells. It was reported to induce the angio-fibrotic switch in diabetic retinopathy and to be involved in remodeling of the extracellular matrix in glaucoma.<sup>88–90</sup>

Our RNA-Seq analysis revealed that many of the deregulated genes of the Hippo pathway in *rd10* retina are also

related to other key signaling pathways, consistent with the idea that Hippo/YAP acts as a central node integrating a variety of signals. It is indeed well recognized that Hippo signaling establishes crosstalks with pathways such as Wnt, TGF $\beta$ , mTOR, or Notch.<sup>91–95</sup> Among these pathways, some have been linked to retinal pathologies. For instance, uncontrolled Wnt signaling may cause familial exudative vitreoretinopathy, retinitis pigmentosa, and Norrie's disease.<sup>96</sup> The mTOR pathway is affected during cone degeneration in retinitis pigmentosa and its inhibition results in the loss of red/green opsin.<sup>97</sup> Therefore, it will be important to further explore the relationships in the retina between these pathways and Hippo signaling components identified in the present study.

## CONCLUSIONS

As a whole, our work revealed differential expression of Hippo pathway components in a retinal degenerative model, which warrants further investigation to unveil its significance in terms of Müller cell reactivation and photoreceptor neuroprotection in diseased retina.

## Acknowledgments

The authors thank Eric Jacquet and Prishila Ponien for their help with the RT-qPCR (Platform qPCR of the ICSN, CNRS). They also thank Elodie-Kim Grellier for her help with the maintenance of mouse colonies and Megan Barnes for her technical assistance. The authors also thank Thierry Léveillard for providing the access to KBaSS database.

Supported by grants to MP from the FRM, Idex Paris-Saclay, Association Retina France and Fondation Valentin Haüy. They acknowledge NEI intramural research program for support as well as Anand Swaroop and the Neurobiology Neurodegeneration & Repair Laboratory (NNRL) for their support on whole transcriptome sequencing. AH was a Retina France association and an ARC fellow.

RNA-Seq data reported in this paper has been submitted to Gene Expression Omnibus (GEO), accession number GSE94534.

Disclosure: **A. Hamon**, None; **C. Masson**, None; **J. Bitard**, None; **L. Gieser**, None; **J.E. Roger**, None; **M. Perron**, None

## References

1. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. *Glia*. 2013;61:651–678.
2. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. 2016;51:1–40.
3. Shen W, Fruttiger M, Zhu L, et al. Conditional Müller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *J Neurosci*. 2012;32:15715–15727.
4. Byrne LC, Khalid F, Lee T, et al. AAV-mediated, optogenetic ablation of Müller glia leads to structural and functional changes in the mouse retina. *PLoS One*. 2013;8:1–13.
5. Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, et al. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28:423–451.
6. Belecky-Adams TL, Chernoff EC, Wilson JM, Dharmarajan S. Reactive Müller glia as potential retinal progenitors. *Neural Stem Cells New Perspect*. 2013;75.
7. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006;25:397–424.

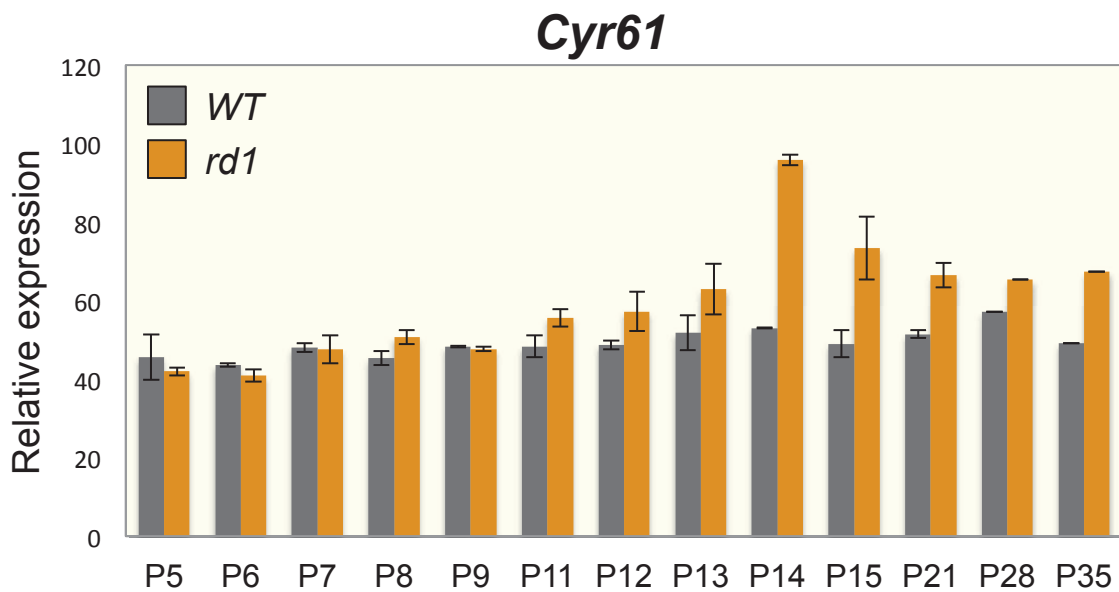
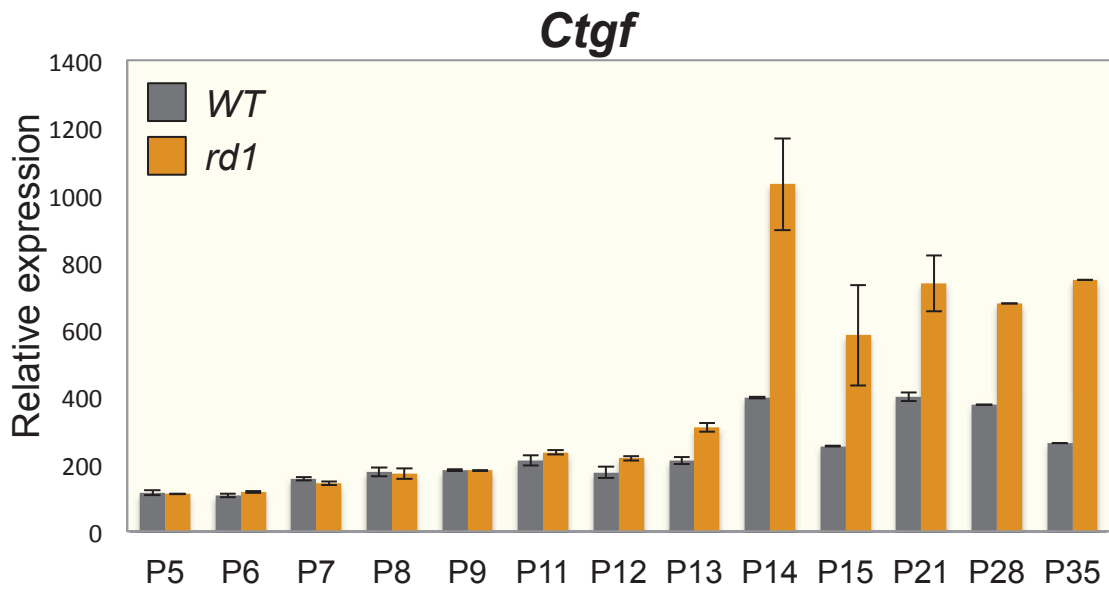
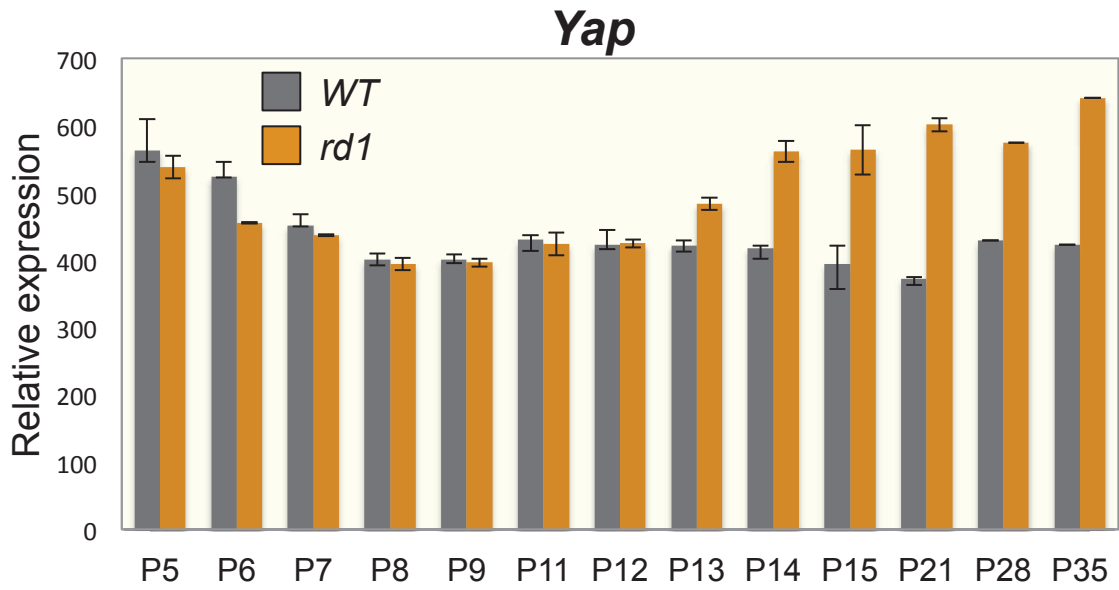
8. Goldman D. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15:431–442.
9. Hamon A, Roger JE, Yang XJ, Perron M. Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: an overview across vertebrate model systems. *Dev Dyn.* 2016:1–12.
10. Lenkowski JR, Raymond P. Müller glia: stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog Retin Eye Res.* 2014;40(January):94–123.
11. Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh T. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:19508–19513.
12. Wan J, Ramachandran R, Goldman D. HB-EGF is necessary and sufficient for Müller glia dedifferentiation and retina regeneration. *Dev Cell.* 2012;22:334–347.
13. Zelinka CP, Volkov L, Goodman ZA, et al. mTor-signaling is required for the formation of proliferating Müller glia-derived progenitor cells in the chick retina. *Development.* 2016; (April):1859–1873.
14. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development.* 2014; 141:1614–1626.
15. Mao B, Gao Y, Bai Y, Yuan Z. Hippo signaling in stress response and homeostasis maintenance. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015;47:2–9.
16. Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. *Cell.* 2015;163:811–828.
17. Meng Z, Moroishi T, Guan K-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 2016;30:1–17.
18. Zhu C, Li L, Zhao B. The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014;47:16–28.
19. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev.* 2010;24:862–874.
20. Del Re DP, Yang Y, Nakano N, et al. Yes-associated protein isoform 1 (Yap1) promotes cardiomyocyte survival and growth to protect against myocardial ischemic injury. *J Biol Chem.* 2013;288:3977–3988.
21. Grijalva JL, Huizenga M, Mueller K, et al. Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2014; 307:G196–G204.
22. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:63–79.
23. Hayashi S, Tamura K, Yokoyama H. Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for *Xenopus* limb bud regeneration. *Dev Biol.* 2014;388:57–67.
24. Hayashi S, Ochi H, Ogino H, et al. Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Dev Biol.* 2014;396:31–41.
25. Jiang Q, Liu D, Gong Y, et al. Yap is required for the development of brain, eyes, and neural crest in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;384:114–119.
26. Asaoka Y, Hata S, Namae M, Furutani-Seiki M, Nishina H. The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PLoS One.* 2014;9(5).
27. Miesfeld JB, Gestri G, Clark BS, et al. Yap and Taz regulate retinal pigment epithelial cell fate. *Development.* 2015;142: 3021–3032.
28. Cabochette P, Vega-Lopez G, Bitard J, et al. Yap controls retinal stem cell DNA replication timing and genomic stability. *Elife.* 2015;4(September 2015):1–23.
29. Zhang H, Deo M, Thompson RC, Uhler MD, Turner DL. Negative regulation of Yap during neuronal differentiation. *Dev Biol.* 2012;361:103–115.
30. Williamson KA, Rainger J, Floyd JAB, et al. Heterozygous loss-of-function mutations in YAP1 cause both isolated and syndromic optic fissure closure defects. *Am J Hum Genet.* 2014;94:295–302.
31. Li Z, Zhao B, Wang P, Chen F, Dong Z, Yang H. Structural insights into the YAP and TEAD complex service. *Genes Dev.* 2010:235–240.
32. Fossdal R, Jonasson F, Kristjansdottir GT, et al. A novel TEAD1 mutation is the causative allele in Sveinsson's chorioretinal atrophy (helicoid peripapillary chorioretinal degeneration). *Hum Mol Genet.* 2004;13:975–981.
33. Hao H, Kim DS, Klocke B, et al. Transcriptional regulation of rod photoreceptor homeostasis revealed by in vivo NRL targetome analysis. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002649.
34. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics.* 2009;25:1105–1111.
35. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015;31:166–169.
36. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009;26:139–140.
37. Brooks MJ, Rajasimha HK, Roger JE, Swaroop A. Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and *Nrl(-/-)* retinal transcriptomes. *Mol Vis.* 2011; 17:3034–3054.
38. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3:research0034.
39. Grove M, Kim H, Santerre M, et al. YAP/TAZ initiate and maintain Schwann cell myelination. *eLife.* 2017;6:1–27.
40. Liu X, Li H, Rajurkar M, et al. Tead and AP1 coordinate transcription and motility. *Cell Rep.* 2016;14:1169–1180.
41. Chang B, Hawes NL, Pardue MT, et al. Two mouse retinal degenerations caused by missense mutations in the beta-subunit of rod cGMP phosphodiesterase gene. *Vision Res.* 2007;47:624–633.
42. Phillips MJ, Ottosen DC, Sherry DM. Progression of neuronal and synaptic remodeling in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *J Comp Neurol.* 2010;518:2071–2089.
43. McLaughlin ME, Ehrhart TL, Berson EL, Dryja TP. Mutation spectrum of the gene encoding the beta subunit of rod phosphodiesterase among patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(April):3249–3253.
44. Uren PJ, Lee JT, Doroudchi MM, Smith AD, Horsager A. A profile of transcriptomic changes in the rd10 mouse model of retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2014;20:1612–1628.
45. Mears J, Kondo M, Swain PK, et al. *Nrl* is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet.* 2001;29:447–452.
46. Zhao B, Ye X, Yu J, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 2008:1962–1971.
47. Lai D, Ho KC, Hao Y, Yang X. Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets *Cyr61* and *CTGF*. *Cancer Res.* 2011;71:2728–2738.
48. Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickman C. The rd mouse story: seventy years of research on an animal model of

- inherited retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 1994;12:31-64.
49. Ait-Ali N, Fridlich R, Millet-Puel G, et al. Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis. *Cell.* 2015;161:817-832.
  50. Riepe RE, Norenberg MD. Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. *Nature.* 1977;268:654-655.
  51. Muto A, Iida A, Satoh S, Watanabe S. The group E Sox genes Sox8 and Sox9 are regulated by Notch signaling and are required for Müller glial cell development in mouse retina. *Exp Eye Res.* 2009;89:549-558.
  52. Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J Comp Neurol.* 2007;500:222-238.
  53. Srivastava P, Sinha-mahapatra SK, Ghosh A, Srivastava I. Differential alterations in the expression of neurotransmitter receptors in inner retina following loss of photoreceptors in rd1 mouse. *PLoS One.* 2015;10:e0123896.
  54. Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5:749-757.
  55. Chen YY, Liu SL, Hu DP, Xing YQ, Shen Y. N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in mice. *Exp Eye Res.* 2014;121:102-113.
  56. Suga A, Sadamoto K, Fujii M, Mandai M, Takahashi M. Proliferation potential of Müller glia after retinal damage varies between mouse strains. *PLoS One.* 2014;9:e94556.
  57. Kohno H, Sakai T, Kitahara K. Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006;244:90-95.
  58. Ooto S, Akagi T, Kageyama R, et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13654-13659.
  59. Close JL, Liu J, Gumuscu B, Reh TA. Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal rat retina. *Glia.* 2006;54:94-104.
  60. Osakada F, Ooto S, Akagi T, Mandai M, Akaike A, Takahashi M. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci.* 2007;27:4210-4219.
  61. Fischer AJ, Bongini R. Turning Müller glia into neural progenitors in the retina. *Mol Neurobiol.* 2010;42:199-209.
  62. Löffler K, Schäfer P, Völkner M, Holdt T, Karl MO. Age-dependent Müller glia neurogenic competence in the mouse retina. *Glia.* 2015;63:1809-1824.
  63. Ramos A, Camargo FD. The Hippo signaling pathway and stem cell biology. *Trends Cell Biol.* 2012;22:339-346.
  64. Hiemer SE, Varelas X. Stem cell regulation by the Hippo pathway. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2013;1830:2323-2334.
  65. Yin MX, Zhang L. Hippo signaling in epithelial stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014;47:39-45.
  66. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton D. "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* 2002;298:597-600.
  67. Tamm C, Böwer N, Annerén C. Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J Cell Sci.* 2011;124:1136-1144.
  68. Lian I, Kim J, Okazawa H, et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 2010;24:1106-1118.
  69. Qin H, Hejna M, Liu Y, et al. YAP induces human naive pluripotency. *Cell Rep.* 2016;14:2301-2312.
  70. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, et al. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr Biol.* 2007;17:2054-2060.
  71. Avruch J, Zhou D, Fitamant J, Bardeesy N. Mst1/2 signalling to Yap: gatekeeper for liver size and tumour development. *Br J Cancer.* 2011;104:24-32.
  72. Cao X, Pfaff SL, Gage FH. YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes Dev.* 2008;22:3320.
  73. Bai H, Zhang N, Xu Y, et al. Yes-associated protein regulates the hepatic response after bile duct ligation. *Hepatology.* 2012;56:1097-1107.
  74. Cai J, Zhang N, Zheng Y, De Wilde RF, Maitra A, Pan D. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev.* 2010;24:2383-2388.
  75. Gregorieff A, Liu Y, Inanlou MR, Khomchuk Y, Wrana JL. Yap-dependent reprogramming of Lgr5+ stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature.* 2015;526:715-718.
  76. Dupont S, Morsut L, Aragona M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011;474:179-183.
  77. Wada K-I, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development.* 2011;138:3907-3914.
  78. Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 2012;26:54-68.
  79. Low BC, Pan CQ, Shivashankar GV, Bershadsky A, Sudol M, Sheetz M. YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth. *FEBS Lett.* 2014;588:2663-2670.
  80. Thomas SM, Morgan JT, Wood JA, Murphy CJ, Russell P. Substratum stiffness and latrunculin B modulate the gene expression of the mechanotransducers YAP and TAZ in human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res.* 2013;113:66-73.
  81. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, et al. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell.* 2006;125:987-1001.
  82. Ashraf A, Pervaiz S. Hippo circuitry and the redox modulation of hippo components in cancer cell fate decisions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;69:20-28.
  83. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T. Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in Drosophila. *Nature.* 2012;490:547-551.
  84. Wu H, Xiao Y, Zhang S, et al. The ETS transcription factor GABP is a component of the Hippo pathway essential for growth and antioxidant defense. *Cell Rep.* 2013;3:1663-1677.
  85. Shao D, Zhai P, Del Re DP, et al. A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. *Nat Commun.* 2014;5:3315.
  86. Di Cara F, Maile TM, Parsons BD, et al. The Hippo pathway promotes cell survival in response to chemical stress. *Cell Death Differ.* 2015;22:1526-1539.
  87. Kucharska J, Del Río P, Arango-Gonzalez B, et al. Cyr61 activates retinal cells and prolongs photoreceptor survival in rd1 mouse model of retinitis pigmentosa. *J Neurochem.* 2014;130:227-240.
  88. van Setten GB, Trost A, Schrödl F, et al. Immunohistochemical detection of CTGF in the human eye. *Curr Eye Res.* 2016;41:1571-1579.
  89. Winkler JL, Kedees MH, Guz Y, Teitelman G. Inhibition of connective tissue growth factor by small interfering ribonucleic acid prevents increase in extracellular matrix molecules

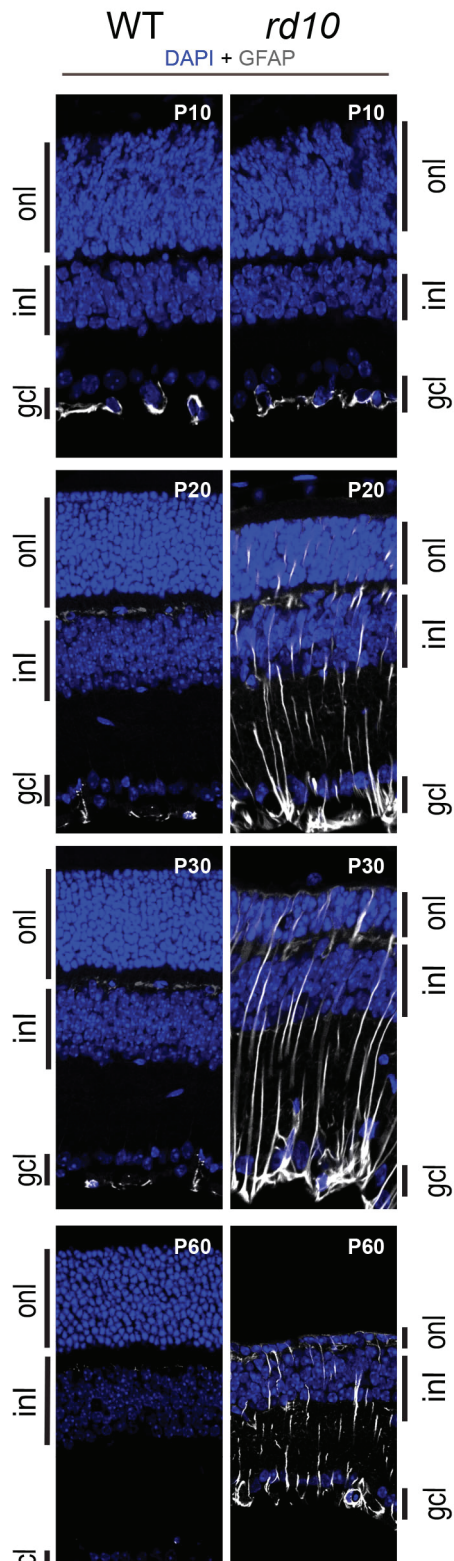
- in a rodent model of diabetic retinopathy. *Mol Vis.* 2012;18:874-886.
90. Junglas B, Kuespert S, Seleem AA, et al. Connective tissue growth factor causes glaucoma by modifying the actin cytoskeleton of the trabecular meshwork. *Am J Pathol.* 2012;180:2386-2403.
91. Barry ER, Camargo FD. The Hippo superhighway: signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25:247-253.
92. Zhou D, Zhang Y, Wu H, et al. Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108:E1312-E1320.
93. Imajo M, Miyatake K, Iimura A, Miyamoto A, Nishida E. A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. *EMBO J.* 2012;31:1109-1122.
94. Saito A, Nagase T. Hippo and TGF- $\beta$  interplay in the lung field. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309:L756-L767.
95. Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russell RC, et al. YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol.* 2012;14:1322-1329.
96. Lad EM, Cheshier SH, Kalani MYS. Wnt-signaling in retinal development and disease. *Stem Cells Dev.* 2009;18:7-16.
97. Punzo C, Kornacker K, Cepko CL. Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci.* 2009;12:44-52.



## Supplementary Figure 1

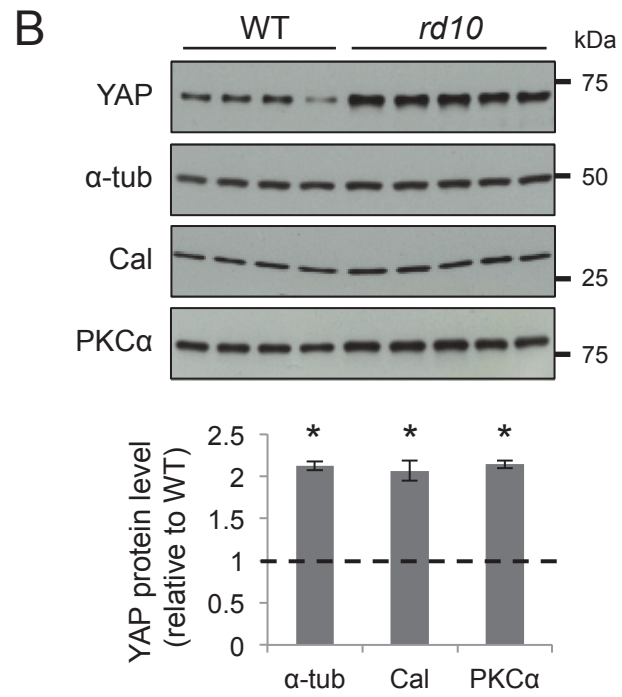
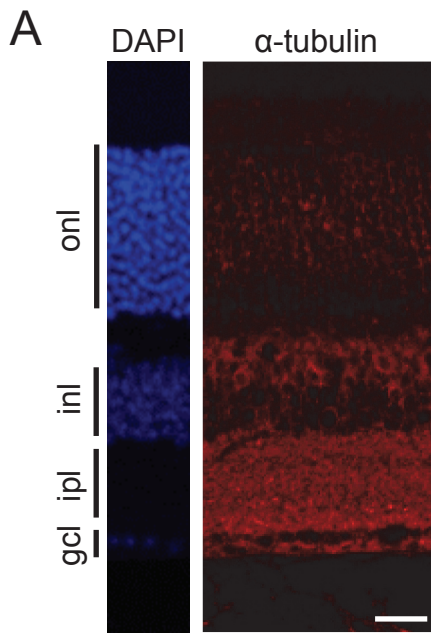


## Supplementary Figure 2

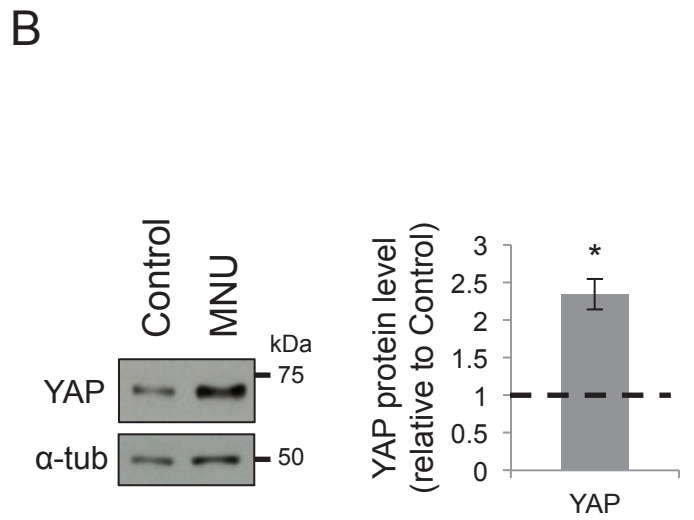
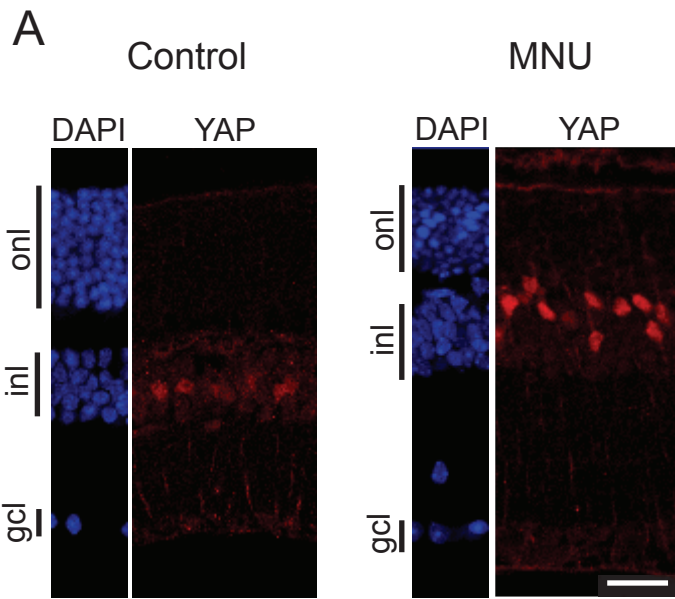


Downloaded From: <http://iovs.arvojournals.org/pdfa>

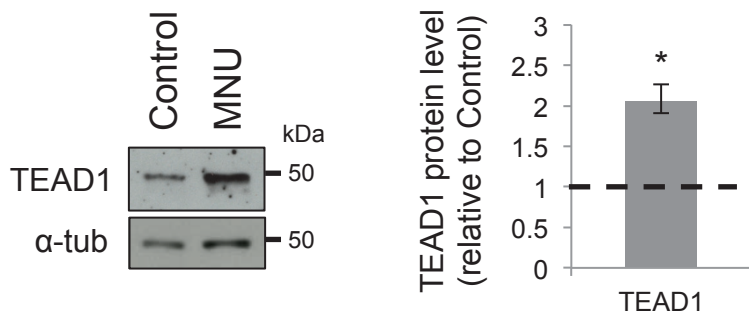
### Supplementary Figure 3



# Supplementary Figure 4



## Supplementary Figure 5



**Supplementary Figure 1: Expression of *Yap*, *Ctgf* and *Cyr61* in *rd1* mouse model.**

Expression of *Yap* (1448363\_at), *Ctgf* (1416953\_at) and *Cyr61* (1416039\_x\_at) during the course of rod degeneration in the *rd1* retina (data retrieved from the KBaSS website).

**Supplementary Figure 2: Reactive gliosis of Müller cells during retinal degeneration in *rd10* mice**

Immunostaining with anti-GFAP (*grey*) antibody on retinal sections of WT and *rd10* mice at different stages from P10 to P60. Nuclei are DAPI counterstained (*blue*).  
*Scale bar*: 20  $\mu\text{m}$ .

**Supplementary Figure 3: Quantification of YAP expression during retinal degeneration in *rd10* mouse model using multiple loading controls**

**(A)** Immunostaining with anti- $\alpha$ -tubulin (*red*) antibody on retinal sections of WT adult mouse. Nuclei are DAPI counterstained (*blue*). **(B)** Western-blot of retinal protein extracts from four WT and five *rd10* mice at P30, probed with anti-YAP, anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub), anti-calbindin (Cal) and anti-PKC  $\alpha$ . Histogram representation corresponds to the quantification of YAP western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) or calbindin (Cal) or PKC  $\alpha$  and relative to WT (dashed line). Mean values  $\pm$  SEM are shown. \* indicates  $p$ -value  $\leq 0.05$  (Mann-Whitney test). onl: outer nuclear layer; inl: inner nuclear layer; ipl: inner plexiform layer; gcl: ganglion cell layer. *Scale bar*: 20  $\mu\text{m}$ .

#### **Supplementary Figure 4: YAP expression during MNU-induced retinal degeneration**

**(A)** Immunostaining with anti-YAP (*red*) antibody on retinal sections of WT mice 72hrs after PBS (Control) or MNU injection. Nuclei are DAPI counterstained (*blue*).

**(B)** Representative western-blots of retinal protein extracts from WT mice 72hrs after PBS (Control) or MNU injection, probed with anti-YAP antibody or anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) as a loading control. Bars represent quantified YAP western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin and relative to the control condition (dashed line). Mean values  $\pm$  SEM are shown. \* indicates  $p$ -value  $\leq 0.05$  (Mann-Whitney test). Scale bar: 20  $\mu$ m.

#### **Supplementary Figure 5: TEAD1 expression during MNU-induced retinal degeneration**

Representative western-blots of retinal protein extracts from WT mice 72hrs after PBS (Control) or MNU injection, probed with anti-TEAD1 antibody or anti- $\alpha$ -tubulin as a loading control. Histogram representation of the quantification of TEAD1 western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) and relative to the control condition (dashed line). Mean values  $\pm$  SEM are shown. \* indicates  $p$ -value  $\leq 0.05$  (Mann-Whitney test).

## Supplementary Table 1

PRIMERS	SEQUENCE
<i>Yap</i> forward	5' TCCTGATGGATGGGAGCAAG 3'
<i>Yap</i> reverse	5' CTCTGGTTCATGGCAAACGA 3'
Tead1 forward	5' TCTGGGCGGACTTAACTGC 3'
Tead1 reverse	5' GAACCTCGCATACTCCGTCTCT 3'
Tead2 forward	5' CGGAAGCCTGGTTATTGAGC 3'
Tead2 reverse	5' TTCCAGAAGAGCAAGGAGGG 3'
Cyr61 forward	5' TGAAGAGGCTTCCTGTCTTTGG 3'
Cyr61 reverse	5' CGGCACTCTGGGTGTCATT 3'
Ctgf forward	5' GCCCTAGCTGCCTACCGACT 3'
Ctgf reverse	5' AGAACAGGCGCTCCACTCTG 3'
Gak forward	5' CTGCCCACCAGGCATTTG 3'
Gak reverse	5' CCATGTCACATACATATTCAATGTACCT 3'
MRPI46 forward	5' GGGAGCAGGCATTCCTACAG 3'
MRPI46 reverse	5' GGTCCGGTCATTTTTTTTGTCA 3'
SRP72 forward	5' CACCCAGCAGACAGACAAACTG 3'
SRP72 reverse	5' GCACTCATCGTAGCGTTCCA 3'
Tbp forward	5' CACAGGAGCCAAGAGTGAAGAAC 3'
Tbp reverse	5' ATCACAGCTCCCCACCATGT 3'



## Supplementary Table 2

### Primary antibodies

ANTIGENE	HOST	SUPPLIER	CATALOG #	DILUTION (IF)	DILUTION (WB)
YAP	mouse	Abcam	ab56701	1:50	1:1,000
Glutamine Synthetase	mouse	Abcam	ab64613	1:500	
SOX9	rabbit	EMD Millipore	AB5535	1:300	
TEAD1	rabbit	LifeSpan Biosciences	LS-B6651	1:50	1:1,000
GFAP	rabbit	DAKO	Z0334	1:500	
Calbindin D-28k	rabbit	Swant	300		1:500
PKC $\alpha$	rabbit	Sigma-Aldrich	P4334		1:100,000
$\alpha$ -tubulin	mouse	Sigma-Aldrich	T5168	1:5,000	1:200,000

### Secondary antibodies

NAME	HOST	SUPPLIER	CATALOG #	DILUTION (IF)	DILUTION (WB)
Alexa Fluor 555 anti-mouse Ig2A	goat	Thermo Scientific	Fisher A21127	1:200	
Alexa Fluor 488 anti-rabbit	goat	Thermo Scientific	Fisher A21206	1:200	
Alexa Fluor 633 anti-mouse IgG1	goat	Thermo Scientific	Fisher A21240	1:200	
Alexa Fluor 647 anti-rabbit	goat	Thermo Scientific	Fisher A21244	1:200	
HRP anti-mouse IgG	goat	Sigma-Aldrich	A4416		1:5,000
HRP anti-rabbit IgG	goat	Sigma-Aldrich	A4416		1:5,000

### Supplementary Table 3. Pathway-level analysis of DEG in *rd10* mouse model

KEGG ID	PATHWAY	NB OF COUNTS	GENES
mmu04151	PI3K-Akt signaling pathway	18	Atf4, Col1a2, Col2a1, Col4a6, Creb3l2, Csf1, Csf3r, Ghr, Il4ra, Itgb1, Itgb5, lama5, Lamb2, Lamc1, Myb, Osmr, Pgf, Vwf
mmu05200	Pathways in cancer	17	Arnt, Cebpa, Col4a6, Csf3r, E2f1, Foxo1, Itgb1, Lama5, Lamb2, Lamc1, Mlh1, Msh2, Pgf, Smad3, Smad4, Stat3, Tgfb2
mmu04630	Jak-STAT signaling pathway	14	Cish, Csf3r, Fhl1, fGhr, Ifngr1, Il10ra, Il13ra1, Il4ra, Il6st, Osmr, Socs2, Socs3, Stat3, Stat6
mmu04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	12	Csf1, Csf3r, Ghr, Ifngr1, Il10ra, Il13ra1, Il1r1, Il1rap, Il4ra, Il6st, Osmr, Tgfb2
mmu05202	Transcriptional misregulation in cancer	12	Bcl6, Cebpa, Ewsr1, Foxo1, Id2, Kdm6a, Maf, Mllt3, Nfkbiz, Pbx3, Sin3a, Smad1
mmu04512	ECM-receptor interaction	11	Aggrn, Col1a2, Col2a1, Col4a6, Itgb1, Itgb5, Lama5, Lamb2, Lamc1, Npnt, Vwf
mmu04390	Hippo signaling pathway	11	Ajuba, Ctgf, Id2, Itgb2, Smad1, Smad3, Smad4, Sox2, Tead2, Tgfb2, Yap1
mmu04550	Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	10	Id2, Id4, Il6st, Isl1, Pax6, Smad1, Smad3, Smad4, Sox2, Stat3

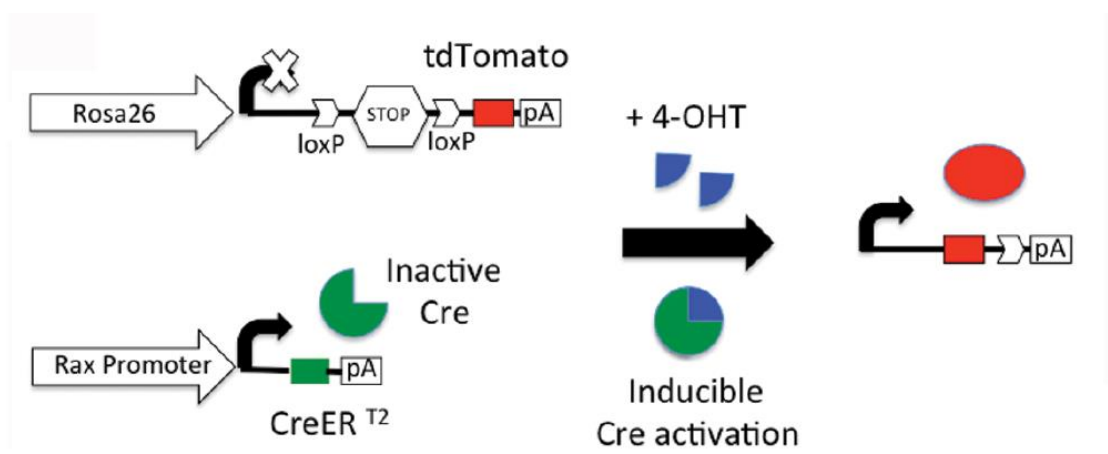


Figure 49: Schéma représentant l'expression de la tdTomato induite par la Cre recombinase qui est sous la régulation du promoteur Rax et est activée par le 4-OHT. D'après (Pak et al. 2014).

## II. ANALYSE FONCTIONNELLE DU RÔLE DE YAP DANS LES CELLULES DE MÜLLER

A la vue de nos résultats suggérant l'implication de YAP dans la réactivation des cellules de Müller au cours de la dégénérescence rétinienne et des données de la littérature montrant le rôle crucial de YAP dans la régénération tissulaire et la biologie des cellules souches, j'ai entrepris l'étude fonctionnelle de cette protéine dans les cellules de Müller chez la souris. Nous avons décidé d'opter pour une stratégie de perte de fonction et pour cela, j'ai généré par croisements une lignée de souris permettant la délétion du gène *Yap* spécifiquement dans les cellules de Müller et à un temps donné. Dans ce modèle, j'ai étudié l'impact de l'absence de YAP en condition physiologique et en condition de dégénérescence des photorécepteurs induite par le MNU.

Publication associée (en préparation):

**Hamon A**, Bitard J, Roger JE, Perron M. YAP-EGFR axis contributes to Müller glia reactivation upon photoreceptor degeneration.

### 1. Modèles utilisés

Afin d'établir la délétion conditionnelle de *Yap* spécifiquement dans les cellules de Müller nous avons utilisé la souris *Rax-CreER<sup>T2</sup>; Ai9* qui permet l'expression d'une Cre recombinase inducible par l'hydroxytamoxifène (4-OHT) spécifiquement dans les cellules de Müller de la rétine post-natale (Pak et al. 2014). L'allèle *Ai9* est un allèle rapporteur d'activité de la Cre recombinase (Figure 49). Ces souris ont été croisées avec des souris *Yap<sup>flox/flox</sup>* (Reginensi et al. 2013) afin d'établir la lignée *Yap<sup>flox/flox</sup>; Rax-CreER<sup>T2</sup>; Ai9* permettant d'induire la délétion du gène *Yap* dans les cellules de Müller par l'injection de 4-OHT. Les souris ont reçu une dose de 4-OHT (1 mg) à P10.

Le modèle de dégénérescence rétinienne induite par le MNU utilisé dans cette étude a été présenté page 131.



## 2. Principaux résultats

- La perte de YAP dans les cellules de Müller résulte en la diminution de l'expression de plusieurs protéines spécifiques des cellules de Müller, dont une enzyme clé de la voie métabolique du glutamate, et conduit à une diminution de l'acuité visuelle chez les souris âgées de 9 mois.
- En condition de dégénérescence, la perte de YAP dans les cellules de Müller empêche l'augmentation d'expression de nombreux gènes associés à la prolifération cellulaire caractéristique de la réactivation des cellules gliales en réponse à la mort des photorécepteurs.
- En condition de dégénérescence, la perte de YAP réduit l'activité de la voie de signalisation EGFR dans les cellules de Müller réactivées *via* la régulation de l'expression des ligands et des récepteurs de cette voie mitogène.

Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent que YAP est nécessaire au maintien de l'homéostasie rétinienne *via*, au moins en partie, la régulation du métabolisme du glutamate, et est essentiel à la réactivation des cellules de Müller *via*, au moins en partie, la régulation de la voie EGFR.



## **Article n°2**

Annaïg Hamon, Juliette Bitard, Jérôme E. Roger, Muriel Perron.

**YAP-EGFR axis contributes to Müller glia reactivation upon photoreceptor degeneration.**





**YAP-EGFR axis contributes to Müller glia reactivation upon photoreceptor degeneration**

**Annaïg Hamon<sup>1,2</sup>, Juliette Bitard<sup>2</sup>, Jérôme Roger<sup>2\*</sup> and Muriel Perron<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> Paris-Saclay Institute of Neuroscience, CNRS, Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, 91405, France

<sup>2</sup> Centre d'Etudes et de Recherche Thérapeutique en Ophtalmologie (CERTO), Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Retina France, Orsay, 91405, France

\* corresponding authors



## **Abstract**

In the neuroretina, the effector of the Hippo pathway, YAP, is specifically expressed in Müller glial cells and its expression is increased in a degenerative context. This is of particular interest considering that YAP is a key player in stem cell biology and that Müller cells have well-known stemness properties. Increasing our knowledge of the complex molecular response of Müller cells to retinal degeneration is thus essential for the development of promising new therapeutic strategies. In this study, we sought to determine YAP functions in Müller cells under both physiological and pathological conditions. We discovered that Müller cell conditional knock-out of *Yap* leads to the deregulation of Müller cell specific genes, including regulators of glutamate metabolism. We found that the perturbation of this central retinal detoxification process persisted during mouse aging, and that old mutant mice exhibited a stress response and visual function impairment. These results indicate that YAP is required in Müller glial cells for maintaining retinal homeostasis. In degenerative conditions, our work revealed that several aspects of Müller cell response were affected in absence of YAP. In particular, we found that YAP is required to trigger cell cycle gene upregulation that occurs in reactive Müller glial cells following photoreceptor cell death. Moreover, our data suggest that YAP activates the mitogenic EGFR signaling in reactive Müller cells, through the regulation of EGFR pathway ligand and receptor expression. These findings highlight that YAP plays a pivotal role in the molecular network underlying Müller cell response to injury.

**Key words:** Müller cells, reactive gliosis, cell cycle re-entry, Hippo/YAP pathway, EGFR pathway



## INTRODUCTION

Neurodegenerative retinal diseases, such as retinitis pigmentosa or age-related macular disease, lead to photoreceptor cell death, resulting in vision loss. One therapeutic strategy would be to stimulate the retina to endogenously regenerate and replace lost cells. A cellular source of interest are Müller cells which are the main glial cell type in the retina, essential for maintaining retinal homeostasis (Bringmann et al., 2006). Upon retinal damage, Müller glia exhibit stemness potential in certain species such as zebrafish or *Xenopus*. They can re-enter into the cell cycle, reacquiring a progenitor-like state, and spontaneously regenerate lost photoreceptors (Fausett and Goldman, 2006; Bernardos et al., 2007; Ramachandran et al., 2012; Wan et al., 2012, 2014; Nagashima et al., 2013; Goldman, 2014; Rajaram et al., 2014; Hamon et al., 2016; Langhe et al., 2017). In post-hatched chick, acute retinal injury also triggers a proliferative and neurogenic response of Müller cells, although this ability declines with age (Fischer and Reh, 2003; Fischer, 2005). In contrast, the spontaneous proliferative response of mammalian Müller glia to injury is extremely limited. Nonetheless, any kind of retinal damage elicits a response from these cells, called reactive gliosis, involving morphological, biochemical, and physiological changes (Bringmann et al., 2009a). Gliosis is thought to represent a cellular attempt to limit tissue damages, for instance through the uptake of excess glutamate or the release of anti-oxidant and neuroprotective factors (Liberto et al., 2004). On the other hand, reactive gliosis, by forming scar tissue, can impede the regenerative potential of Müller cells (Karl and Reh, 2010). Apprehending further the molecular mechanisms underlying Müller cell response to injury may help identifying therapeutic targets favoring the beneficial and/or preventing the detrimental effects of reactive gliosis.

The proliferative and neurogenic potential of mammalian Müller cells has been demonstrated by the mean of various manipulations, such as the addition of exogenous factors or the overexpression of the proneural gene *Asc1a* (Ueki et al., 2015; Hamon et al., 2016; Wilken and Reh, 2016; Jorstad et al., 2017). One well-known mitogenic signaling for Müller cells is the epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway. HB-EGF stimulates proliferation of Müller cells in chick or rodents via activation of MAPK/extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling (Close et al., 2006; Karl et al., 2008; Todd et al., 2015). Wnt, Notch and Hedgehog signalling pathways are also able to trigger the proliferation of mammalian Müller cells following injury (Das et al., 2006; Osakada et al., 2007; Wan et al., 2007; Del Debbio et al., 2010, 2016; Liu et al., 2013; Yao et al., 2016). However, how these different pathways intersect with each other remains poorly understood. Therefore, increasing our knowledge of this signaling network is crucial to get more insights into the mechanisms by which quiescent Müller cells switch to a proliferative state.

The purpose of the present study was to investigate whether the Hippo pathway influences Müller cell reactivation and if so how it would intersect with other critical signaling pathways. The Hippo pathway, originally identified in *Drosophila* as a regulator of organ growth, has emerged as a key pathway in vertebrates, regulating a wide range of biological processes including cell proliferation, cell death, cell differentiation, organ size control, tissue homeostasis, and cancer development (Pan, 2010; Yu and Guan, 2013; Yu et al., 2015b). The core kinase cascade of the Hippo pathway comprises Mst1/2 and Lats1/2, which leads to the phosphorylation of the transcriptional coactivators, Yes-associated protein 1 (YAP1, hereafter called YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ), resulting in their cytosolic retention and degradation. Upon Hippo pathway inactivation, YAP/TAZ translocate

into the nucleus and interact with TEA domain (TEAD) family of transcription factors to regulate the transcription of target genes. The pathway emerged as a signaling integrator of several other prominent signaling pathways. In particular, an EGFR-Hippo pathway link has been demonstrated in various cell types (Zhang et al., 2009; Fan et al., 2013; Reddy and Irvine, 2013; Hansen et al., 2015; Chen and Harris, 2016).

YAP/TAZ are increasingly being recognized as key actors in stem cell biology (Qin et al., 2012, 2016; Mo et al., 2014). It has recently been discovered that YAP/TAZ can act as reprogramming factors. Their activation can indeed turn differentiated cells into their corresponding somatic stem cells (Pancier et al., 2016). Under homeostatic conditions, YAP/TAZ are critical for self-renewal and differentiation of various types of adult stem cells such as skeletal stem cells or airway basal stem cells (Zhao et al., 2014; Tang et al., 2016). Although they appear dispensable in certain type of stem cells under physiological conditions, their function is required under pathological conditions, as described for instance for the regeneration of the intestinal epithelium following injury (Barry et al., 2013; Gregorieff et al., 2015). As such, YAP overexpression has been shown to be able to stimulate regeneration of several injured organs, such as the mammalian heart, liver, intestine (Del Re et al., 2013; Grijalva et al., 2014; Johnson and Halder, 2014) or the *Xenopus* tail and limb (Hayashi et al., 2014a; b).

YAP involvement in adult neural tissue repair has hitherto not been investigated. We recently found that YAP and TEAD1 are specifically expressed in mouse Müller cells (Hamon et al., 2017). Moreover, we uncovered that their expression and activity are enhanced upon injury (Hamon et al., 2017). Hence, we sought to determine YAP contribution to Müller cell function under physiological conditions but also following injury. We therefore generated conditional knockout mice with Müller-specific deletion



of *Yap* in differentiated retina using an inducible Cre recombinase. Under physiological conditions, we found that Müller cell specific factors were deregulated in mutant mice and unveiled age-related retinal stress response and visual defects. Interestingly, under acute induced retinal degeneration, whole transcriptome sequencing coupled to biochemical assays and histological analysis revealed that YAP is required to trigger cell cycle gene upregulation that occurs in Müller glial cells following photoreceptor cell death. Moreover, our data suggest that YAP and the EGFR pathway might intersect to promote Müller glia cell cycle reentry.

## RESULTS

### ***Yap* conditional knock-out in retinal Müller cells does not affect retinal histology**

To investigate the role of YAP in Müller cells, we conditionally ablated *Yap* gene in Müller glial cells by breeding *Yap<sup>fllox/fllox</sup>* mice (Reginensi et al., 2013) with *Rax-CreER<sup>T2</sup>* mice (Pak et al., 2014). Homologous recombination of this 4-hydroxytamoxifen-inducible Cre recombinase at the *Rax* locus has been shown in the neuroretina to be specifically expressed in Müller cells from post-natal day 7 (P7) onwards (Pak et al., 2014). To induce the deletion of *Yap* in fully differentiated Müller cells, we activated the Cre recombinase at P10 by 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) intraperitoneal injection (Figure 1A). Phenotypic analyses were made on 2-month-old mice, thereafter named *Yap* CKO mice. Western blot and immunohistochemical analyses of *Yap* CKO mice carrying the Rosa26-CAG-lox-stop-lox-TdTomato (*Rax-CreER<sup>T2</sup>;Ai9*) reporter transgene confirmed Müller cell-specific Cre expression and showed efficient Cre-mediated deletion of *Yap* (Figure 1B,C and data not shown). Because YAP was shown to inversely regulate the abundance of TAZ protein (the second effector of the Hippo pathway) by proteasomal degradation in mammalian cell lines (Finch-Edmondson et

al., 2015), we assessed whether TAZ expression could be increased in our model and thus potentially compensate for *Yap* deletion. Western blot experiments showed that TAZ protein level is not changed in *Yap* CKO mice compared to controls (Figure 1C). Histological analysis by hematoxylin and eosin staining (H&E) of *Yap* CKO retinas revealed normal laminar organization (Figure 2A) with similar ONL and INL thickness between *Yap* CKO and control retinas (Figure 2B). Immunostaining for Rhodopsin to label rod photoreceptors, and for Arrestin, Peanut Agglutinin (PNA), and S-opsin to label cones, revealed no change in signal intensity or subcellular distribution (Figure 2C). Immunofluorescence analysis using Calbindin, Calretinin, PKC $\alpha$  and Brn3a, as horizontal, amacrine, bipolar and ganglion cell markers respectively, revealed no difference between *Yap* CKO and control retinas (Figure 2C). Together, this first analysis demonstrates that lack of YAP expression from P10 does not impact retinal maturation and the overall cellular structure in 2-month-old *Yap* CKO mice.

### ***Yap* deletion affects the expression of several Müller cell-specific proteins**

We next performed a thorough phenotypic analysis of Müller cells in *Yap* CKO retinas. We observed normal position and distribution of Müller cells nuclei labelled by Sox9 on *Yap* CKO retinal sections (Figure 3A). It is known that in case of stress, Müller cells increase their expression of intermediate filament proteins, such as glial fibrillary acidic protein (GFAP) or Vimentin, indicative of a reactive gliosis state (Bringmann et al., 2006; Reichenbach and Bringmann, 2013; De Hoz et al., 2016). By immunostaining, we did not observe any increased expression of these two proteins in comparison to control retinas, suggesting that Müller cells are not reactive in absence of *Yap* in 2-month old mice (Figure 3B). However, we observed by immunostaining and validated

by western blot that several Müller specific proteins are affected by *Yap* deletion. We showed that Glutamine Synthetase (GS) protein level is reduced in *Yap* CKO (Figure 4A,B). This enzyme, localized exclusively in Müller cells within the retina, is responsible for glutamate recycling into glutamine and as such is a crucial player of neurotransmitters metabolism in the retina (de Melo Reis et al., 2008; Bringmann et al., 2009b; Reichenbach and Bringmann, 2013). Aquaporin-4 (AQP4) protein level is also significantly decreased in *Yap* CKO Müller cells compared to control mice (Figure 4A,B). This Müller cell-expressed protein is involved in water transport and as such is essential for the maintenance of osmotic homeostasis of the retina (Bringmann et al., 2004, 2006; Nagelhus et al., 2004; Vecino et al., 2016). Finally, we also observed decreased expression of two cell cycle associated proteins specifically expressed in Müller cells nuclei: Cyclin D1 and Cyclin D3 (Figure 4C,D). These proteins are known to regulate G1 phase progression during the cell cycle (Massagué, 2004). In the retina, they are commonly used to label Müller cells nuclei. However, their function in these cells under physiological conditions is not known. To evaluate whether downregulation of these Müller specific proteins (GS, AQP4, Cyclin D1, Cyclin D3) could impact retinal function and thus impair visual signal transduction, we performed electroretinogram (ERG) recordings on *Yap* CKO and control mice. Both scotopic and photopic ERG recordings did not reveal any significant differences between *Yap* CKO and control mice (Figure 4E). Taken together, these results demonstrate that although *Yap* deletion in Müller cells leads to a significant decrease level of multiple key proteins, it does not lead to visual impairment in a 2-month-old mice.

### **Yap deletion in Müller cells leads to retinal visual defects during aging**

We found that the reduction in GS protein level is still observed and even more dramatic in 9-month old *Yap* CKO mice compared to controls (Figure 5B). Inhibition of GS has been shown to cause Müller cell distress, neurotoxicity, and impaired retinal response to light (Gorovits et al., 1997; Barnett et al., 2000; Jablonski et al., 2001; Bringmann et al., 2013). We thus wondered whether the decreased expression observed from 2 month onwards in *Yap* CKO mice of this enzyme, together with the decreased expression of other proteins such as AQP4 and CyclinD1/3, could eventually lead to retinal dysfunction and stress with time. To this aim, we analyzed in 9-month old mice the expression of GFAP, as an indicator of retinal stress. This revealed higher levels of GFAP in *Yap* CKO retina compared to controls (Figure 6C). Since there was barely no expression of GFAP in the retina of 2-month-old mice (Figure 3B), such an increase during aging likely reflects age-related Müller cells stress response. Of note, the modest upregulation of GFAP in Müller cells observed in wild type old mice has already been reported, suggestive of low-level physiological stress occurring naturally during aging (Wu et al., 2003). To assess whether *Yap* CKO dependent stress was associated to visual impairment, we recorded dark- and light-adapted ERG. Scotopic a- and b-waves were similar between controls and *Yap* CKO mice (Figure 5E). This indicates that rod photoreceptors of *Yap* CKO mice function normally (reflected by a-wave) and that visual signal is properly transmitted through the inner retina (reflected by the b-wave). Strikingly however, photopic b-wave in *Yap* CKO mice exhibited a significant decrease, suggesting an alteration of the cone vision pathway (Figure 5E). This suggests that YAP is required in Müller cells to maintain retinal integrity in the aging mice under physiological conditions.

## **Attenuation of Müller glial reactivation upon photoreceptor degeneration in the absence of *Yap***

We next sought to investigate the role of YAP in Müller cell reactivation in a degenerative context. We thus triggered retinal degeneration in *Yap* CKO mice by the mean of methylnitrosourea (MNU) injections, a well-established paradigm for inducible photoreceptor cell death (Chen et al., 2014). All the analyses were performed 16 hours after MNU injection, when photoreceptor cell death is just beginning (Supplementary Figure 1) to evaluate the early response of Müller cells to injury (Figure 6A). At first, we validated our model by assessing YAP protein level in MNU-injected *Yap* CKO and control mice, to assess the induction of YAP expression previously described (Hamon et al., 2017). Immunoblot analysis confirmed the upregulation of *Yap* expression in controls in response to MNU injections, as well as the extremely low YAP protein expression level in MNU-injected *Yap* CKO mice (Figure 6B). We next examined TAZ expression following *Yap* deletion in a degenerative context. As such, we found that TAZ is strongly upregulated following MNU injection with an even larger increase in MNU-injected *Yap* CKO mice (Figure 6B). This data reveals a compensatory increase of TAZ only under degenerative context. Yet, we wondered whether the sole YAP knockdown could lead to an alteration of Müller cell reactivation following photoreceptor cell death. Immunostaining experiments using anti-GFAP antibody showed a significant increase in GFAP labeling in Müller cells 16h hours after MNU injection compared to uninjected mice (Figure 6C). GFAP labeling is even more increased in *Yap* CKO mice injected with MNU, with labeling being detected from the endfeet of Müller cells to the outer plexiform layer (Figure 6C). This result suggests that Müller cell response to photoreceptor degeneration is modified in absence of *Yap*. We thus next decided to investigate on a large scale basis, the molecular impact of

*Yap* deletion in reactive Müller cells under degenerative conditions, by performing a whole transcriptome sequencing of *Yap* CKO retinas of MNU-injected mice. We performed gene level analysis of the sequencing data using criteria of FC 1.5 with a P value cutoff of 0.05 and a minimum expression of one FPKM in at least one sample. We identified 4900 differentially expressed genes (DEGs) in 16h post-MNU injected control mice retinas compared to WT non-injected ones, reflecting the global and massive molecular response of the retina following MNU injection (Figure 7A). In MNU-injected *Yap* CKO mice retinas, we identified 305 DEGs in comparison to MNU-injected control mice (Figure 7A). Among these 305 DEGs, more than 75% of them are down-regulated (Figure 7B). Using Panther classification system based on Gene Ontology (GO) analysis we obtained the list of the biological processes significantly enriched in our dataset (Supplementary Table 1). For clarity purposes, we present in Figure 7C the most relevant biological processes significantly overrepresented in the absence of *Yap* following MNU injection. Among them, we identified “response to chemical”, “regulation of cell proliferation” and “inflammatory response”, with 107, 70, and 35 DEGs respectively, suggesting that lack of YAP expression in Müller cells profoundly alter the molecular response to retinal injury (Figure 7C).

### ***Yap* knock-out prevents cell cycle genes up-regulation in reactive Müller cells**

Among the different biological processes previously identified during our GO analysis, “regulation of cell proliferation” clearly raised our interest since YAP is considered as a key regulator of cell cycle genes in other cellular contexts (Ehmer and Sage, 2016). In addition, we showed above under physiological conditions that lack of YAP expression led to a decreased expression of CyclinD1 and CyclinD3 in the retina (Figure 4). Therefore, we extracted all the DEGs related to this GO term and generated

a hierarchical clustering. The heatmap showed segregation into 3 groups according to the z-score scale (Figure 7D). We focused on the group of DEGs that contains 52 genes related to cell proliferation that are less responding to the injury in the absence of YAP. These are indeed (i) expressed at very low levels in non-injected mice, (ii) strongly upregulated in MNU injected mice, while (iii) only moderately enriched in MNU injected *Yap* CKO mice (Figure 7D). Among those, and consistently with what we found in physiological conditions, *Ccnd1* and *Ccnd3* (encoding Cyclin D1 and Cyclin D3, respectively) were found significantly decreased in MNU-injected *Yap* CKO mice compared to MNU-injected control mice (Figure 8A). Two other cell cycle regulators, *Ccnd2* and *Cdk6*, exhibited the same profile (Figure 8A). We confirmed the decrease of *Ccnd1* and *Ccnd3* expression by RT-qPCR (Figure 8B). We further showed by both immunostaining and western blot that Cyclin D1 and Cyclin D3 proteins were down-regulated in MNU-injected *Yap* CKO mice compared to MNU-injected control mice (Figure 8C,D). Taken together, these results demonstrate that YAP is necessary for the up-regulation of cell cycle genes, D-Cyclins and cyclin-dependent kinase, in Müller cells in response to injury.

### ***Yap* deletion affects EGFR signaling in reactive Müller cells**

Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway is a well-known mitogenic signaling for Müller cells during retinal degeneration. Epidermal growth factor (EGF) or Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), encoding ligands of EGFR, have indeed been shown to stimulate Müller glial proliferation in zebrafish, chick or rodents (Close et al., 2006; Karl et al., 2008; Wan et al., 2012, 2014; Todd et al., 2015). It is thus noteworthy that several genes of the EGFR pathway were deregulated in absence of *Yap* in MNU injected mice. *Egfr* and *ErbB4* (encoding another receptor of the EGFR

family named Her4), as well as *Hbegf* and *Neuregulin 1* (*Nrg1*, encoding another EGFR ligand) were all down-regulated in MNU-injected *Yap* CKO mice compared to MNU-injected control mice (Figure 9A). It is established that EGFR signaling acts through the activation of the MAPK and the PI3K/AKT pathways. It is also recognized that these pathways are required for Müller cell proliferation in response to growth factor treatment upon injury (Ueki and Reh, 2013; Wang et al., 2016; Beach et al., 2017). We thus investigated whether their activity could be altered in absence of *Yap*, by analyzing the relative levels of ERK1/2 and AKT phosphorylation. Western blot analysis revealed that whereas P-ERK/ERK ratio is strongly increased following MNU injection in control mice, this increase is significantly attenuated in absence of *Yap* (Figure 9B). The same tendency was obtained for P-AKT/AKT ratio (Figure 9B). In order to assess whether the effect on the P-ERK signaling indeed takes place in Müller cells, we performed P-ERK immunostaining. Although P-ERK is barely not detectable in a wild type retina (data not shown), it is strongly and specifically expressed in Müller cells, in both the nuclei and the processes, in MNU-injected mice (Figure 9C). On the other hand, this upregulation is largely attenuated in MNU-injected *Yap* CKO mice (Figure 9C). Together, these results suggest that the absence of *Yap* leads to a reduced activation of EGFR signaling in Müller cells. Moreover, our data indicate that YAP could interact with EGFR signaling pathway through the regulation of the expression of both ligands and receptors of the pathway. Pathway analysis from our RNAseq dataset using Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG), revealed that other genes belonging to the PI3K-AKT and Erbb signaling pathways are also deregulated in *Yap* CKO, with 15 and 6 associated DEGs, respectively (Figure 10). This further supports the existence of a functional link between YAP and EGFR pathway in a degenerating retina.



## DISCUSSION

Here we report on the essential function of YAP under physiological conditions in Müller glial cells for the maintenance of adult retina homeostasis. We further demonstrate that YAP is indispensable for the upregulation of cell cycle genes in gliotic Müller cells following injury. We also highlight that YAP plays a key role in a degenerative retina to activate EGFR signaling in reactive Müller cells, through the regulation of EGFR ligand and receptor expression. These findings imply a pivotal role for YAP in tuning Müller cell response to injury.

YAP knockout in several adult organs in mice, such as liver, pancreas, intestine, and mammary gland, unexpectedly suggested that this factor is dispensable to maintain normal adult tissue homeostasis (Piccolo et al., 2014). In accordance with this, we did not observe any major abnormalities in retinal morphology in *Yap* CKO mice. However, we found that the chronic absence of YAP affects Müller cell normal function leading to cone visual pathway impairment in old mutant mice. The underlying molecular mechanisms may involve AQP4 and GS proteins, which we found deregulated in *Yap* CKO mice and are recognized as important for retinal homeostasis maintenance. AQP4 is involved in the control of ion and osmohomeostasis in Müller cells (Pannicke et al., 2010). AQP4-null old mice exhibit a modest, yet significant, reduction in ERG b-wave amplitude and latency (Li et al., 2002). Furthermore, it has been reported that AQP4 inhibition results in abnormal retinal glutamate metabolism, and leads to a decrease in GS expression (Li et al., 2014; Nishikawa et al., 2016). GS converts glutamate into glutamine and thus enhances the rate of glutamate uptake by Müller cells (Shaked et al., 2002). Pharmacological inhibition of GS expression therefore impairs glutamatergic neurotransmission, and has been shown to affect light response

of the retina, as revealed by a reduced b-wave (Barnett et al., 2000; Jablonski et al., 2001; Bringmann et al., 2013). Therefore, the decreased expression of two regulators of glutamate metabolism in YAP CKO mice could explain that the b-wave, as an indicator of neurotransmission in the retina, is reduced in YAP CKO mice compared to controls in 9 months old mice. Importantly, the *glutamine synthetase* gene, *glul*, has been recently shown to be a direct target of YAP in zebrafish liver cells and in human cells (Cox et al., 2016). It is thus tempting to speculate that *glul* could be as well a direct target gene of YAP in retinal Müller cells. Considering that GFAP is an established indicator of tissular stress, the increased GFAP content observed in YAP CKO Müller cells under acute degeneration and during aging likely reflects retinal stress, resulting, at least in part, from glutamine metabolism disturbance. Of note, AQP4 knockout also results in the increase of GFAP expression (Li et al., 2014). Together, these results highlight for the first time a link between YAP and Müller cell glutamine metabolism, suggesting that YAP could thereby protect the retina from glutamate-induced neurotoxicity. Knowing that recent findings highlighted key metabolic pathways as regulators of YAP activity (Santinon et al., 2016), it would be interesting to investigate whether glutamine metabolism may in turn regulate YAP expression or activity in Müller cells.

In case of retinal injury or stress, Müller glial cells rapidly enter in a reactive gliosis state (Bringmann et al., 2009a; Belecky-Adams et al., 2013; Fernández-sánchez et al., 2015). They undergo characteristic morphological and molecular changes such as cellular hypertrophy, increased expression of intermediate filaments (nestin, vimentin and GFAP) or re-entry into the cell cycle (Bringmann et al., 2009a; Belecky-Adams et al., 2013; Fernández-sánchez et al., 2015). Indeed, after the onset of photoreceptor apoptosis, although reactive Müller glia in C57Bl/6J mice do not progress into S phase,

they systematically upregulate the expression of cell cycle genes belonging to Cyclin D–CDK complexes, known to drive G1 phase progression (Suga et al., 2014). Therefore, one feature of reactive Müller cells is their exit from a quiescent G0 state to enter into G1 phase. This process appears disturbed in the absence of YAP, since both *Cyclin D* and *Cdk* genes are downregulated in *Yap* CKO reactive Müller cells. Remarkably, *Ccnd1* has been described as a potential YAP target gene in chicken neural tube (Cao et al., 2008). However, in this study, the authors suggest that YAP is not required for basal transcription of *Ccnd1* whereas our results show that even in physiological conditions YAP is necessary for normal basal expression of Cyclin D1 in Müller cells, reinforcing the hypothesis that *Ccnd1* is a direct target gene of YAP in Müller glia. Moreover, *CDK6* has also been shown to be a direct target gene of YAP in human cells *in vitro* (Xie et al., 2013). Considering all these data, YAP seems to play a central role in the regulation of cell cycle re-entry of Müller cells in response to injury. Of note, although Cyclin D1 and Cyclin D2 are widely believed to regulate progression through the cell cycle, whether Cyclin D3 promotes cell proliferation is still unclear. Indeed, a transcriptional regulatory role for Cyclin D3 has been reported in several tissues, where it appears to promote cell cycle exit, thereby favoring differentiation (Rojas et al., 2007; Gurung and Parnaik, 2012; De Luca et al., 2013). To our knowledge, the role of Cyclin D3 in reactive Müller cells remains unknown. The link between YAP and Cyclin D3, in terms of Müller glia cell cycle reentry, thus remains to be further investigated.

YAP has been recognized as an integrator of several key signaling pathways (Yu et al., 2015a). Here we reveal a connection between YAP and the EGFR pathway in Müller cells following retinal degeneration. This brings YAP at the core of Müller cell reactivation mechanisms. Indeed, numerous studies demonstrated that EGFR

signaling is required to induce cell-cycle re-entry of Müller cell in different species, including mammals (Close et al., 2005, 2006; Karl et al., 2008; Wan et al., 2012, 2014; Ueki and Reh, 2013; Löffler et al., 2015; Todd et al., 2015). Other studies have previously shown that EGFR signaling and YAP are functionally linked. For instance, the EGFR ligand amphiregulin (AREG) was shown to be a target of YAP in human mammary epithelial cells or in cervical cancer cells (Zhang et al., 2009; He et al., 2015b). We did not find *Areg* in our set of DEGs in *Yap* CKO retinas, but we identified genes encoding two other ligands, HBEGF and NRG1, and two genes encoding receptors of the pathway, EGFR and ERBB4. It has been reported in human ovarian cells that YAP directly regulates these four EGFR pathway components (He et al., 2015a). We can thus speculate that these genes could also be direct transcriptional targets of YAP in Müller cells. Their decreased expression in *Yap* CKO retinas likely underlies the reduced EGFR pathway activity observed in mutated Müller cells, as revealed by levels of ERK1/2 phosphorylation. Interestingly, it was shown *in vivo* that YAP activates EGFR signaling to mediate intestinal regeneration (Gregorieff et al., 2015). Whether forced YAP expression in Müller cells could enhance EGFR signaling, and as such promote their cell cycle re-entry and regenerative potential, is certainly a key question that we are currently investigating.

A positive feedback loop also connects EGFR to YAP. For instance, AREG is not only a downstream target of YAP in cervical cancer cells, but also a regulator, via EGFR, of YAP activity (He et al., 2015b). It has been proposed that EGFR promotes YAP activity through Hippo pathway inhibition (He et al., 2015b). Similarly, it was shown that NRG1, via ERBB4, regulates YAP activity (Haskins et al., 2014; Sudol, 2014; He et al., 2015a; Yan et al., 2017). In this case, the NRG1-induced cleavable form of ERBB4 directly binds to YAP, promoting its nuclear activity (Haskins et al., 2014;

Sudol, 2014; He et al., 2015a; Yan et al., 2017). On the basis of these published data and on our present findings, we propose a model in which the YAP-EGFR axis plays a central role in Müller glia response to injury (Figure 11). This knowledge of the intricate signaling network involved in Müller cell reactivation in a pathological context has important implication for the development of new therapeutic strategies based on endogenous repair of the retina.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Mice**

All animal experiments have been carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EEC), European Union guidelines effective and with the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for the Use of animals in ophthalmic and visual Research. All animal care and experimentation were also conducted in accordance with institutional guidelines, under the institutional license APAFIS#1018-2016072611404304 v1. Mice were kept at 21°C, under a 12-hour light/12-hour dark cycle, with food and water supplied *ad libitum*. *Yap<sup>flox/flox</sup>* mice were obtained from Jeff Wrana lab (Reginensi et al., 2013) and crossed with heterozygous knock-in *Rax-CreER<sup>T2</sup>* mice or double heterozygous *Rax-CreER<sup>T2</sup>, R26-CAG-lox-stop-lox-TdTom (Ai9)* mice from Seth Blackshaw lab (Pak et al., 2014) to generate *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>* and *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>;Ai9* mice. Genotyping was done by PCR using genomic DNA prepared from tail snips. *Yap* floxed allele was detected using the following primers: forward CACCCAGCTATTATAAGTGTGTG and reverse TGTAACAATGTGATAAGTC -AGCC which produce a 287 bp PCR product for WT

allele and a 204 bp product for floxed allele. The presence of the *Rax-CreER<sup>T2</sup>* allele was determined through genotyping for Cre recombinase using the following primers: forward TTCCCGCAGAACCTGAAGAT and reverse CCCCAGAAATGCCAGATTAC which produced a 350 bp PCR product. Genotyping for the *Ai9* transgene was done using the forward primer CTGTTCTGTACGGCATGG and the reverse primer GGCATTAAAGCAGCGTATCC which produce a 296 bp PCR product.

### **Cre induction by 4-hydroxytamoxifen**

4-hydroxytamoxifen (4-OHT) was prepared by sonicating 50 mg of 4-OHT (Sigma-Aldrich) in 2 mL of 100% ethanol at 37° C. 40 µl of 4-OHT/ethanol corresponding to 1mg of 4-OHT was vortexed with 100 µl of corn oil (Sigma-Aldrich), and ethanol removed by vacuum centrifugation. Mice were injected intraperitoneally with a single dose of 1 mg 4-OHT at P10. All mice were injected with 4-OHT and controls was littermates without *Rax-CreER<sup>T2</sup>*.

### **MNU-induced retinal degeneration**

For the chemical-induced retinal degeneration model, mice were given a single intraperitoneal injection of 1-Methyl-1-nitrosourea (MNU) at a dose of 60 mg/kg body weight. The MNU solution (Ark Pharm) was freshly dissolved in sterile physiological saline immediately before use. Control animals received physiological saline. Mice were euthanized 16 hours after MNU injection.

### **Immunohistochemistry and TUNEL essay**

After mouse euthanasia, the eyes were rapidly enucleated. Eucleated eyes were dissected to form posterior segment eye-cups which were then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 1 h at 4°C. Eye-cups were then embedded in paraffin.

Standard immunohistochemistry techniques on paraffin sections were applied with the following specificities: antigen unmasking treatment was done in boiling heat-mediated antigen retrieval buffer (10mM sodium citrate, pH 6.0) for 20 min. Primary antibody was diluted in ready-to-use diluent (Dako). The specificity of the anti-YAP antibody has already been shown by other groups (Grove et al., 2017). Primary and secondary antibodies are listed in Supplementary Table 1. Sections were counterstained with 1:1,000 DAPI (1mg/ml, Thermo Fisher Scientific). TUNEL assay was performed using DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega) according to the manufacturer's instructions.

### **Image acquisition**

Fluorescence and brightfield images were acquired using an ApoTome-equipped AxioImager.M2 microscope or a Zeiss LSM710 confocal microscope. Image processing was performed using Zen (Zeiss) and Fiji (National Institutes of Health) softwares. Images were taken around the optic nerve. The same magnification, laser intensity, gain and offset settings were used across animals for any given marker. All experiments were done in triplicates.

### **Western-blotting**

Western-blot was performed on single retina, at least on 3 individuals per condition, unless otherwise specified in the figure legends. Eyes were removed and retinas were quickly isolated and frozen at -80°. Retinas were lysed in P300 buffer (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 mM NaCl; 30 mM NaPPi; 0.1% Nonidet P-40; 5 mM EDTA; 5mM DTT) and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Lysates concentration was determined using a Lowry protein assay kit (DC Protein Assay; Bio-Rad). Equal amounts of proteins (20 µg/lane) of each sample were loaded, separated by 7.5% SDS-PAGE

(Bio-Rad) and transferred onto nitrocellulose membranes. Western blots were then conducted using standard procedures. Primary and secondary antibodies are listed in Supplementary Table 1. An enhanced chemiluminescence kit (Bio-Rad) was used to detect the proteins. Each sample was probed once with tubulin for normalization. Quantification was done using Fiji software (National Institutes of Health).

### **Electroretinographic analysis**

Electroretinograms (ERGs) were recorded using a Micron IV focal ERG system (Phoenix Research Labs). Mice were dark adapted overnight and prepared for recording in darkness under dim-red illumination. Mice were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (90 mg/ kg, Merial) and xylazine (8 mg/kg, Bayer), and were topically administered tropicamide (0.5%) and phenylephrine (2.5%) for pupillary dilation. Flash ERG recordings were obtained from one eye. ERG responses were obtained at increasing light intensities over the ranges of -1.7 to 2.2 log cd·s/m<sup>2</sup> under dark-adapted conditions, and -0.5 to 2.8 log cd·s/m<sup>2</sup> under a background light that saturates rod function. The stimulus interval between flashes varied from 0.7 s at the lowest stimulus strengths to 15 s at the highest ones. Five to thirty responses were averaged depending on flash intensity. Analysis of a-wave and b-wave amplitudes was performed using LabScribeERG software. The a-wave amplitude was measured from the baseline to the negative peak and the b-wave was measured from the a-wave trough to the maximum positive peak.



### **Whole transcriptome sequencing (RNA-Seq) and data analysis.**

Whole transcriptome analysis was performed on three independent biological replicates from MNU-injected Control and *Yap* CKO retina at postnatal stage 60 (P60). After harvesting, both retinas for each animal were collected and immediately frozen. RNA was extracted using Nucleospin RNA Plus kit, which includes DNase treatment (Macherey-Nagel). RNA quality and quantity were evaluated using a BioAnalyzer 2100 with RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies). Stranded RNA-Seq libraries were constructed from 100 ng of high quality total RNA (RIN > 8) using the TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina). Paired-end sequencing of 40 bases length was performed on a NextSeq 500 system (Illumina). Pass-filtered reads were mapped using HISAT2 2.1.0 and aligned to mouse reference genome GRCm38 (Kim et al., 2015; Pertea et al., 2016). Count table of the gene features was obtained using FeatureCounts (Liao et al., 2014). Normalization, differential expression analysis and FPKM (fragments per kilobase of exon per million fragments mapped) values were computed using EdgeR (Robinson et al., 2009). An FPKM filtering cutoff of 1 in at least one of the 6 samples was applied. A *p-value* of less than or equal to 0.05 was considered significant and a cutoff of a fold change of 1.5 was applied to identify differentially expressed isoforms. GO annotation was obtained using PANTHER classification system and pathways analysis was done using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG). Visualization of functional analysis data were done using GOplot R package (Walter, 2015).

### **RNA extraction and gene expression analysis by real-time PCR.**

RT-qPCR experiment was performed on at least three mice per condition. Total RNA was extracted from neural retina using RNeasy mini kit (Qiagen) and treated with DNase I according to the manufacturer's instructions. RNA quantity was assessed using the NanoDrop 2000c UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). Total RNA was reverse transcribed in the presence of oligo-(dT)20 using Superscript II reagents (Thermo Fisher Scientific). For each RT-qPCR, a ten-fold dilution of the cDNA was used, and the reactions were performed in triplicates on a CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Differential expression analysis was performed using the  $\Delta\Delta C_t$  method using the geometric average of, *Rps26*, *Srp72* and *Tbp* as the endogenous controls (Vandesompele et al., 2002). For each gene, the relative expression of each sample was calculated using the mean of the controls as the reference (1 a.u.). Primers used were as follows (gene, forward sequence, reverse sequence):

*Ccnd1*, CCCAACAACTTCCTCTCCTG, TCCAGAAGGGCTTCAATCTG

*Ccnd3*, CGAGCCTCCTACTTCCAGTG, GGACAGGTAGCGATCCAGGT

*Rps26*, CCCAAGGATAAGGCCATCAAG, AAGCACGTAGGCGTCAAGA

*Srp72*, CACCCAGCAGACAGACAACTG, GCACTCATGGTAGCGTTCCA

*Tbp*, CACAGGAGCCAAGAGTGAAGAAC, ATCACAGCTCCCCACCATGT

### **Quantification and statistical analysis**

All results are reported as mean  $\pm$  SEM. Non-parametric Mann-Whitney test was used to analyze western-blot and RT-qPCR data. p-value  $\leq 0.05$  was considered significant.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to S. Blackshaw for the *Rax-CreER<sup>T2</sup>* mouse line and to J. Wrana and S. Meilhac for the *Yap<sup>flox/flox</sup>* mouse line. We are grateful to Elodie-Kim Grellier and Sophie Lourdel for their help with the maintenance of mouse colonies. We would also like to thank Elodie-Kim Grellier for her technical assistance with the ERG experiments. This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing core facility of I2BC (Centre de Recherche de Gif - <http://www.i2bc-saclay.fr/>). This research was supported by grants to M.P. from the FRM, Association Retina France and Fondation Valentin Haüy. A.H. is a Retina France association and an ARC fellow.

## REFERENCES

- Barnett NL, Pow D V., Robinson SR. 2000. Inhibition of Muller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glia* 30:64–73.
- Barry ER, Morikawa T, Butler BL, Shrestha K, de la Rosa R, Yan KS, Fuchs CS, Magness ST, Smits R, Ogino S, Kuo CJ, Camargo FD. 2013. Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature* 493:106–10.
- Beach KM, Wang J, Otteson DC. 2017. Regulation of Stem Cell Properties of Müller Glia by JAK/STAT and MAPK Signaling in the Mammalian Retina. *Stem Cells Int* 2017:1–15.
- Belecky-Adams TL, Chernoff EC, Wilson JM, Dharmarajan S. 2013. Reactive Muller Glia as Potential Retinal Progenitors. *Neural Stem Cells - New Perspect*:75.
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA. 2007. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27:7028–7040.
- Bringmann A, Grosche A, Pannicke T, Reichenbach A. 2013. GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:1–14.

- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. 2009a. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 28:423–451.
- Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Iandiev I, Grosche J, Wiedemann P, Albrecht J, Reichenbach A. 2009b. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54:143–160.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397–424.
- Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. 2004. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res* 36:241–249.
- Cao X, Pfaff SL, Gage FH. 2008. YAP regulates neural progenitor cell number via the TEA domain transcription factor. *Genes Dev* 22:3320.
- Chen J, Harris RC. 2016. Interaction of the EGF Receptor and the Hippo Pathway in the Diabetic Kidney. *J Am Soc Nephrol* 27:1689–1700.
- Chen Y yuan, Liu S liang, Hu D ping, Xing Y qiao, Shen Y. 2014. N -methyl- N -nitrosourea-induced retinal degeneration in mice. *Exp Eye Res* 121:102–113.
- Close JL, Gumuscu B, Reh TA. 2005. Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development* 132:3015–3026.
- Close JL, Liu J, Gumuscu B, Reh TA. 2006. Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal rat retina. *Glia* 54:94–104.
- Cox AG, Hwang KL, Brown KK, Evason KJ, Beltz S, Tsomides A, O'Connor K, Galli GG, Yimlamai D, Chhangawala S, Yuan M, Lien EC, Wucherpfennig J, Nissim S, Minami A, Cohen DE, Camargo FD, Asara JM, Houvras Y, Stainier DYR, Goessling W. 2016. Yap reprograms glutamine metabolism to increase nucleotide biosynthesis and enable liver growth. *Nat Cell Biol* 18:886–896.
- Das A V, Mallya KB, Zhao X, Ahmad F, Bhattacharya S, Thoreson WB, Hegde G V, Ahmad I. 2006. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 299:283–302.
- Del Debbio CB, Balasubramanian S, Parameswaran S, Chaudhuri A, Qiu F, Ahmad I. 2010. Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by müller cells in adult mammalian retina. *PLoS One* 5:e12425.

- Del Debbio CB, Mir Q, Parameswaran S, Mathews S, Xia X, Zheng L, Neville AJ, Ahmad I. 2016. Notch Signaling Activates Stem Cell Properties of Müller Glia through Transcriptional Regulation and Skp2-mediated Degradation of p27Kip1. *PLoS One* 11:e0152025.
- Ehmer U, Sage J. 2016. Control of Proliferation and Cancer Growth by the Hippo Signaling Pathway. *Mol Cancer Res* 14:127–140.
- Fan R, Kim N-G, Gumbiner BM. 2013. Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1. *Proc Natl Acad Sci* 110:2569–2574.
- Fausett B V, Goldman D. 2006. A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci* 26:6303–6313.
- Fernández-sánchez L, Lax P, Campello L, Pinilla I, Cuenca N. 2015. Astrocytes and Müller Cell Alterations During Retinal Degeneration in a Transgenic Rat Model of Retinitis Pigmentosa. 9:1–16.
- Finch-Edmondson ML, Strauss RP, Passman AM, Sudol M, Yeoh GC, Callus BA. 2015. TAZ protein accumulation is negatively regulated by YAP abundance in mammalian cells. *J Biol Chem* 290:27928–27938.
- Fischer AJ. 2005. Neural regeneration in the chick retina. *Prog Retin Eye Res* 24:161–182.
- Fischer AJ, Reh T a. 2003. Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* 43:70–76.
- Goldman D. 2014. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci* 15:431–42.
- Gorovits R, Avidan N, Avisar N, Shaked I, Vardimon L. 1997. Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration in injured retinal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:7024–7029.
- Gregorieff A, Liu Y, Inanlou MR, Khomchuk Y, Wrana JL. 2015. Yap-dependent reprogramming of Lgr5+ stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature* 526:715–8.
- Grijalva JL, Huizenga M, Mueller K, Rodriguez S, Brazzo J, Camargo F, Sadri-Vakili G, Vakili K. 2014. Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 307:G196-204.

- Grove M, Kim H, Santerre M, Krupka AJ, Han SB, Zhai J, Cho JY, Park R, Harris M, Kim S, Sawaya BE, Kang SH, Barbe MF, Cho S-H, Lemay MA, Son Y-J. 2017. YAP/TAZ initiate and maintain Schwann cell myelination. *Elife* 6:1–27.
- Gurung R, Parnaik VK. 2012. Cyclin D3 promotes myogenic differentiation and Pax7 transcription. *J Cell Biochem* 113:209–219.
- Hamon A, Masson C, Bitard J, Gieser L, Roger JE, Perron M. 2017. Retinal Degeneration Triggers the Activation of YAP/TEAD in Reactive Müller Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 58:1941.
- Hamon A, Roger JE, Yang X-J, Perron M. 2016. Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: An overview across vertebrate model systems. *Dev Dyn* 245:727–38.
- Hansen CG, Moroishi T, Guan K. 2015. YAP and TAZ : a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol* 25:499–513.
- Haskins JW, Nguyen DX, Stern DF. 2014. Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration. *Sci Signal* 7:ra116-ra116.
- Hayashi S, Ochi H, Ogino H, Kawasumi A, Kamei Y, Tamura K, Yokoyama H. 2014a. Transcriptional regulators in the Hippo signaling pathway control organ growth in *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Dev Biol* 396:31–41.
- Hayashi S, Tamura K, Yokoyama H. 2014b. Yap1, transcription regulator in the Hippo signaling pathway, is required for *Xenopus* limb bud regeneration. *Dev Biol* 388:57–67.
- He C, Lv X, Hua G, Lele SM, Remmenga S, Dong J, Davis JS, Wang C. 2015a. YAP forms autocrine loops with the ERBB pathway to regulate ovarian cancer initiation and progression. *Oncogene* 34:6040–6054.
- He C, Mao D, Hua G, Lv X, Chen X, Angeletti PC, Dong J, Remmenga SW, Rodabaugh KJ, Zhou J, Lambert PF, Yang P, Davis JS, Wang C. 2015b. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO Mol Med* 7:1426–49.
- De Hoz R, Rojas B, Ramirez AI, Salazar JJ, Gallego BI, Triviño A, Ramírez JM. 2016. Retinal Macroglial Responses in Health and Disease. *Biomed Res Int* 2016.

- Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A. 2001. Pigment epithelium-derived factor supports normal Müller cell development and glutamine synthetase expression after removal of the retinal pigment epithelium. *Glia* 35:14–25.
- Johnson R, Halder G. 2014. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov* 13:63–79.
- Jorstad L, Wilken MS, Grimes WN, Wohl SG, Vandenbosch LS, Yoshimatsu T, Wong RO, Rieke F, Reh TA. 2017. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*.
- Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh TA. 2008. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19508–19513.
- Karl MO, Reh TA. 2010. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends Mol Med* 16:193–202.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12.
- Langhe R, Chesneau A, Colozza G, Hidalgo M, Ail D, Locker M, Perron M. 2017. Müller glial cell reactivation in *Xenopus* models of retinal degeneration. *Glia*:1–17.
- Li J, Patil R V., Verkman AS. 2002. Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Müller cell aquaporin-4 water channels. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 43:573–579.
- Li XM, Wendu R Le, Yao J, Ren Y, Zhao YX, Cao GF, Qin J, Yan B. 2014. Abnormal glutamate metabolism in the retina of aquaporin 4 (AQP4) knockout mice upon light damage. *Neurol Sci* 35:847–853.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. Sequence analysis featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW. 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J Neurochem* 89:1092–1100.
- Liu B, Hunter DJ, Rooker S, Chan A, Paulus YM, Leucht P, Nusse Y, Nomoto H, Helms JA. 2013. Wnt signaling promotes Müller cell proliferation and survival after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:444–53.

- Löffler K, Schäfer P, Völkner M, Holdt T, Karl MO. 2015. Age-dependent Müller glia neurogenic competence in the mouse retina. *Glia* 63:1809–1824.
- De Luca G, Ferretti R, Bruschi M, Mezzaroma E, Caruso M. 2013. Cyclin D3 critically regulates the balance between self-renewal and differentiation in skeletal muscle stem cells. *Stem Cells* 31:2478–2491.
- Massagué J. 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432:298–306.
- de Melo Reis R, Ventura A, Schitine C, de Mello M, de Mello F. 2008. Müller Glia as an Active Compartment Modulating Nervous Mu Activity in the Vertebrate Retina : Neurotransmitters and Trophic Factors. *Neurochem Res* 33:1466–1474.
- Mo J-S, Park HW, Guan K-L. 2014. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep* 15:642–56.
- Nagashima M, Barthel LK, Raymond PA. 2013. A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. *Development* 140:4510–4521.
- Nagelhus EA, Mathiisen TM, Ottersen OP. 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129:905–913.
- Nishikawa Y, Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Ikeda T. 2016. Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve. *Exp Eye Res* 146:118–127.
- Osakada F, Ooto S, Akagi T, Mandai M, Akaike A, Takahashi M. 2007. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci* 27:4210–4219.
- Pak T, Yoo S, Miranda-Angulo AM, Wang H, Blackshaw S. 2014. Rax-CreERT2 knock-in mice: A tool for selective and conditional gene deletion in progenitor cells and radial glia of the retina and hypothalamus. *PLoS One* 9:1–13.
- Pan D. 2010. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 19:491–505.
- Pancieria T, Azzolin L, Fujimura A, Di Biagio D, Frasson C, Bresolin S, Soligo S, Basso G, Bicciato S, Rosato A, Cordenonsi M, Piccolo S. 2016. Induction of Expandable Tissue-Specific Stem/Progenitor Cells through Transient Expression of YAP/TAZ. *Cell Stem Cell* 19:725–737.



- Pannicke T, Wurm A, Iandiev I, Hollborn M, Linnertz R, Binder DK, Kohen L, Wiedemann P, Steinhäuser C, Reichenbach A, Bringmann A. 2010. Deletion of aquaporin-4 renders retinal glial cells more susceptible to osmotic stress. *J Neurosci Res* 88:2877–2888.
- Pertea M, Kim D, Pertea GM, Leek JT, Salzberg SL. 2016. Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT , StringTie and Ballgown. *Nat Protoc* 11:1650–1667.
- Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. 2014. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 94:1287–312.
- Qin H, Blaschke K, Wei G, Ohi Y, Blouin L, Qi Z, Yu J, Yeh RF, Hebrok M, Ramalho-santos M. 2012. Transcriptional analysis of pluripotency reveals the hippo pathway as a barrier to reprogramming. *Hum Mol Genet* 21:2054–2067.
- Qin H, Hejna M, Liu Y, Percharde M, Wossidlo M, Blouin L, Durruthy-Durruthy J, Wong P, Qi Z, Yu J, Qi LS, Sebastiano V, Song JS, Ramalho-Santos M. 2016. YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell Rep* 14:2301–2312.
- Rajaram K, Harding RL, Hyde DR, Patton JG. 2014. MiR-203 regulates progenitor cell proliferation during adult zebrafish retina regeneration. *Dev Biol* 392:393–403.
- Ramachandran R, Zhao X-F, Goldman D. 2012. Insm1a-mediated gene repression is essential for the formation and differentiation of Müller glia-derived progenitors in the injured retina. *Nat Cell Biol* 14:1013–1023.
- Del Re DP, Yang Y, Nakano N, Cho J, Zhai P, Yamamoto T, Zhang N, Yabuta N, Nojima H, Pan D, Sadoshima J. 2013. Yes-associated protein isoform 1 (Yap1) promotes cardiomyocyte survival and growth to protect against myocardial ischemic injury. *J Biol Chem* 288:3977–3988.
- Reddy BVVG, Irvine KD. 2013. Regulation of Hippo Signaling by EGFR-MAPK Signaling through Ajuba Family Proteins. *Dev Cell* 24:459–471.
- Reginensi A, Scott RP, Gregorieff A, Bagherie-Lachidan M, Chung C, Lim D-S, Pawson T, Wrana J, McNeill H. 2013. Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet* 9:e1003380.
- Reichenbach A, Bringmann A. 2013. New functions of Müller cells. *Glia* 61:651–678.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2009. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.

- Rojas P, Cadenas MB, Lin P-C, Benavides F, Conti CJ, Rodriguez-Puebla ML. 2007. Cyclin D2 and cyclin D3 play opposite roles in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 26:1723–30.
- Santinon G, Pocaterra A, Dupont S. 2016. Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways. *Trends Cell Biol* 26:289–299.
- Shaked I, Ben-Dror I, Vardimon L. 2002. Glutamine synthetase enhances the clearance of extracellular glutamate by the neural retina. *J Neurochem* 83:574–580.
- Sudol M. 2014. Neuregulin 1 – activated ERBB4 as a “ dedicated ” receptor for the Hippo-YAP pathway. 7:9–11.
- Suga A, Sadamoto K, Fujii M, Mandai M, Takahashi M. 2014. Proliferation potential of Müller glia after retinal damage varies between mouse strains. *PLoS One* 9:e94556.
- Tang Y, Feinberg T, Keller ET, Li X-Y, Weiss SJ. 2016. Snail/Slug binding interactions with YAP/TAZ control skeletal stem cell self-renewal and differentiation. *Nat Cell Biol* 18:917–929.
- Todd L, Volkov LI, Zelinka C, Squires N, Fischer AJ. 2015. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) stimulates the proliferation of Müller glia-derived progenitor cells in avian and murine retinas. *Mol Cell Neurosci* 69:54–64.
- Ueki Y, Reh TA. 2013. EGF stimulates Müller glial proliferation via a BMP-dependent mechanism. *Glia* 61:778–789.
- Ueki Y, Wilken MS, Cox KE, Chipman L, Jorstad N, Sternhagen K, Simic M, Ullom K, Nakafuku M, Reh TA. 2015. Transgenic expression of the proneural transcription factor *Ascl1* in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13717–22.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3:RESEARCH0034.
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 51:1–40.
- Walter W. 2015. Data and text mining GOplot : an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics* 31:2912–2914.

- Wan J, Ramachandran R, Goldman D. 2012. HB-EGF Is Necessary and Sufficient for Müller Glia Dedifferentiation and Retina Regeneration. *Dev Cell* 22:334–347.
- Wan J, Zhao X-F, Vojtek A, Goldman D. 2014. Retinal injury, growth factors, and cytokines converge on  $\beta$ -catenin and pStat3 signaling to stimulate retina regeneration. *Cell Rep* 9:285–97.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun* 363:347–54.
- Wang J, He C, Zhou T, Huang Z, Zhou L, Liu X. 2016. NGF increases VEGF expression and promotes cell proliferation via ERK1 / 2 and AKT signaling in Müller cells. *Mol Vis* 22:254–263.
- Wilken MS, Reh TA. 2016. Retinal regeneration in birds and mice. *Curr Opin Genet Dev* 40:57–64.
- Wu KHC, Madigan MC, Billson FA, Penfold PL. 2003. Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *Br J Ophthalmol* 87:1159–1167.
- Xie Q, Chen J, Feng H, Peng S, Adams U, Bai Y, Huang L, Li J, Huang J, Meng S, Yuan Z. 2013. YAP/TEAD-mediated transcription controls cellular senescence. *Cancer Res* 73:3615–3624.
- Yan F, Tan X, Wan W, Dixon BJ, Fan R, Enkhjargal B, Li Q, Zhang J, Chen G, Zhang JH. 2017. ErbB4 protects against neuronal apoptosis via activation of YAP/PIK3CB signaling pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Exp Neurol* 297:92–100.
- Yao K, Qiu S, Tian L, Snider WD, Flannery JG, Schaffer D V., Chen B. 2016. Wnt Regulates Proliferation and Neurogenic Potential of Müller Glial Cells via a Lin28/let-7 miRNA-Dependent Pathway in Adult Mammalian Retinas. *Cell Rep* 17:165–178.
- Yu F-X, Guan K-L. 2013. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev* 27:355–371.
- Yu F-X, Meng Z, Plouffe SW, Guan K-L. 2015a. Hippo Pathway Regulation of Gastrointestinal Tissues. *Annu Rev Physiol* 77:201–227.
- Yu FX, Zhao B, Guan KL. 2015b. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 163:811–828.

Zhang J, Ji J-Y, Yu M, Overholtzer M, Smolen GA, Wang R, Brugge JS, Dyson NJ, Haber DA. 2009. YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nat Cell Biol* 11:1444–1450.

Zhao R, Fallon TR, Saladi SV, Pardo-Saganta A, Villoria J, Mou H, Vinarsky V, Gonzalez-Celeiro M, Nunna N, Hariri LP, Camargo F, Ellisen LW, Rajagopal J. 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 1: Efficient and Müller cell specific *Yap* conditional knock-out.**

**(A)** Diagram of the experimental procedure shown in B-D. *Yap<sup>flox/flox</sup>;Ai9* mice (Control) and *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>;Ai9* (*Yap* CKO) mice received a single dose of 4-OHT at P10 and were analyzed at P60. **(B)** Retinal sections immunostained with anti-TdTomato (red) antibody or anti-YAP (red) antibody in control and *Yap* CKO retinas. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bar: 20  $\mu$ m. **(C)** Western-blot of retinal protein extracts from four controls and four *Yap* CKO mice probed with anti-YAP or anti-TAZ antibodies as well as anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) as a loading control. Histograms represent YAP and TAZ quantification from western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin and relative to controls. Mean values  $\pm$  SEM are shown. \*\*\* indicates p-value  $\leq$  0.001, ns: non-significant (Mann-Whitney test).

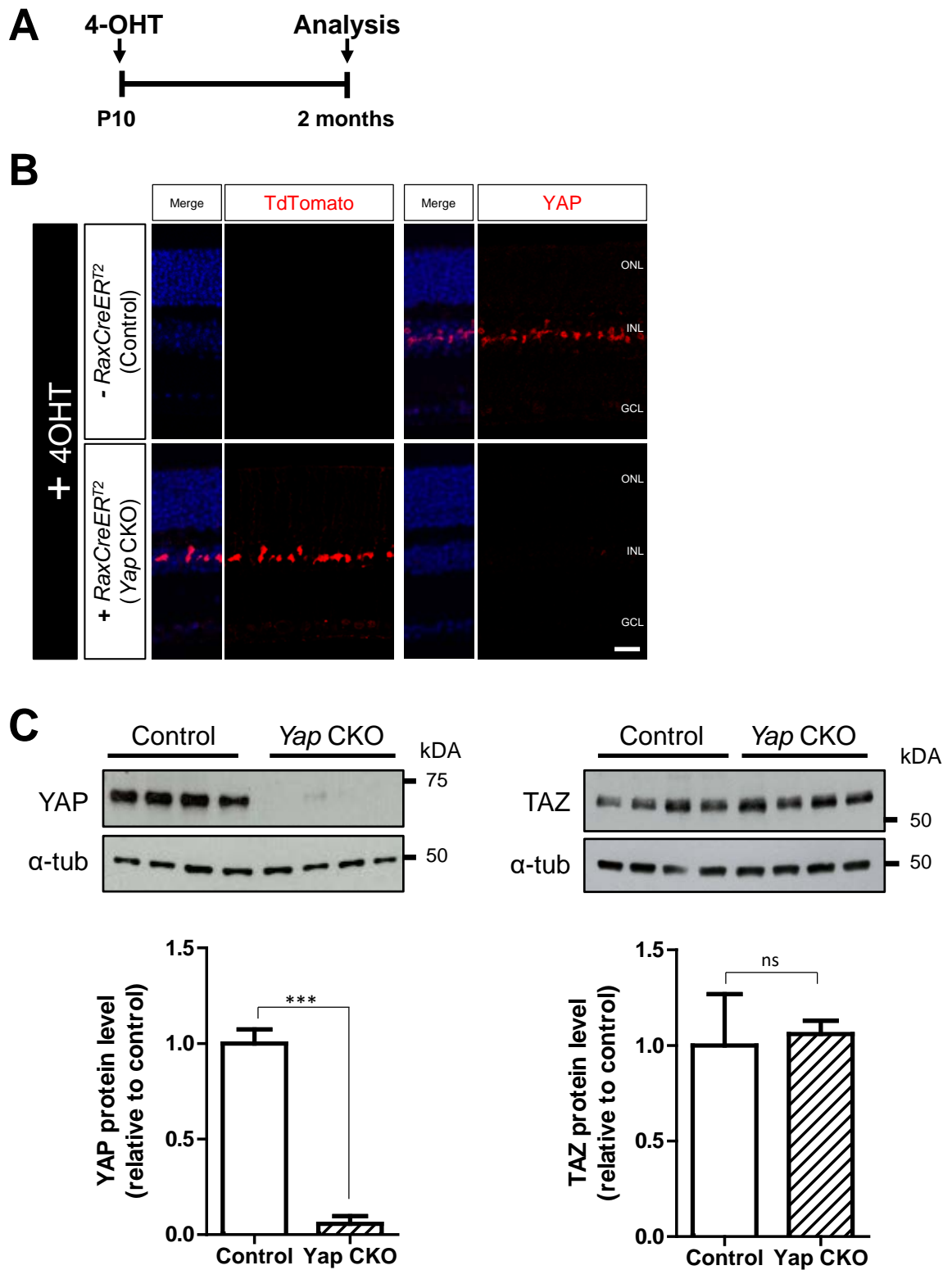
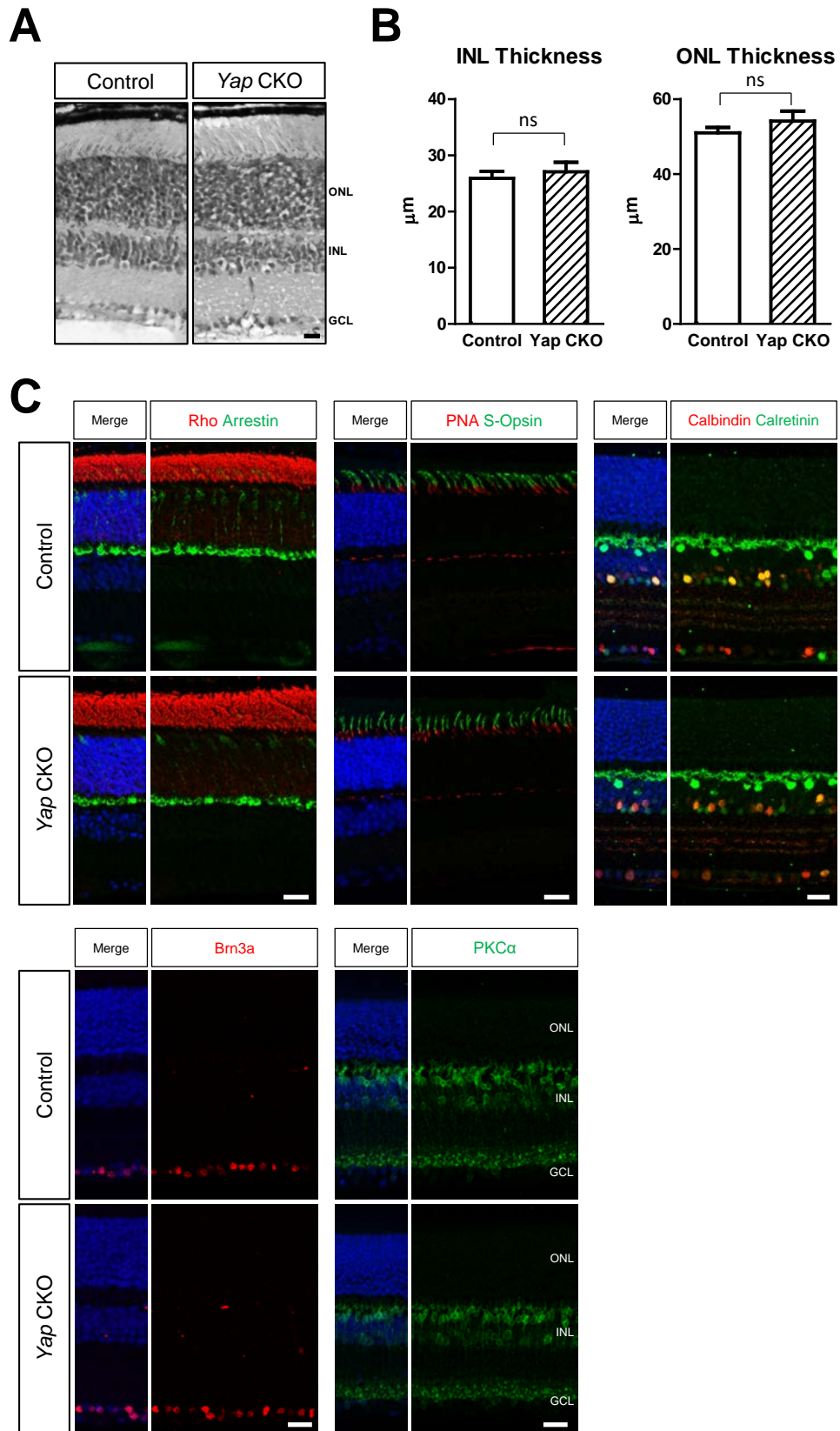


Figure 1

**Figure 2: *Yap* CKO mice do not show any major retinal histology defects.**

**(A)** H&E staining of retinal sections from Control (*Yap<sup>flox/flox</sup>*) and *Yap* CKO (*Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>*) mice. Scale bar: 50  $\mu$ m. **(B)** Inner Nuclear Layer (INL) and Outer Nuclear Layer (ONL) thickness measurements in central retina. Data are represented as mean values  $\pm$  SEM from four Control and four *Yap* CKO mouse retinas are shown. ns: non significant (Mann-Whitney test). **(C)** Retinal sections from Control and *Yap* CKO mice immunostained with a rod photoreceptor marker: anti-Rhodopsin antibody (Rho), cone photoreceptor markers: anti-Arrestin antibody, lectin PNA or anti-S-Opsin antibody, an horizontal cell marker: anti-Calbindin antibody, an amacrine cell marker: anti-Calretinin antibody, a bipolar cell marker: anti-PKC $\alpha$  antibody and a ganglion cell marker: anti-Brn3a antibody. Nuclei are labeled with DAPI (blue). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bars: 20  $\mu$ m.

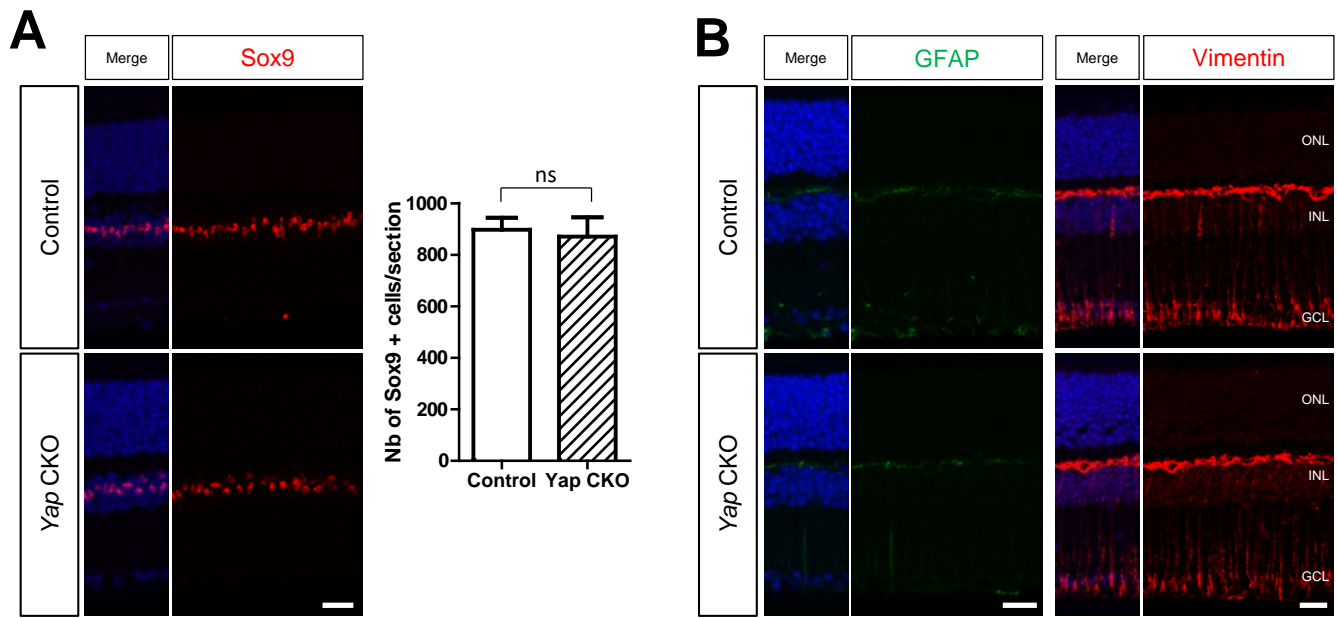


**Figure 2**



**Figure 3: *Yap* CKO mice do not show any modification in the number of Müller cells or in the expression of intermediate filament proteins.**

**(A)** Retinal section from Control (*Yap<sup>flox/flox</sup>*) and *Yap* CKO (*Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreERT<sup>2</sup>*) mice immunostained with anti-Sox9 antibodies (red). The histogram represents the quantification of the mean number of Sox9 positive nuclei per section. Mean values  $\pm$  SEM are shown. One entire section from three independent Control mice and three independent *Yap* CKO mice were manually counted. ns: non significant (Mann-Whitney test). **(B)** Retinal sections from Control and *Yap* CKO mice immunostained with anti-GFAP (green) or anti-Vimentin (red) antibodies. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bars: 20  $\mu$ m.



**Figure 3**

**Figure 4: *Yap* CKO mice show decreased expression of selective Müller cell specific proteins.**

**(A, C)** Retinal sections from Control (*Yap<sup>flox/flox</sup>*) and *Yap* CKO (*Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>*) mice immunostained with anti-GS or anti-AQP4 antibodies (A) or anti-Cyclin D3 antibodies (C). Nuclei are labeled with DAPI (blue). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bar: 20  $\mu$ m. **(B, D)** Western-blot of retinal protein extracts from Control and *Yap* CKO mice probed with anti-GS and anti-AQP4 antibodies (B) or anti-Cyclin D3 and anti-Cyclin D1 antibodies (D). Anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) antibodies serve as loading controls. Histograms represent GS and AQP4 (B) or Cyclin D3 and Cyclin D1 (D) quantifications from western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin and relative to controls. Mean values  $\pm$  SEM are shown. \* indicates p-value  $\leq$  0.05 (Mann-Whitney test). **(E)** Intensity response curves of the average scotopic a-wave, scotopic b-wave and photopic b-wave responses of six Control and nine *Yap* CKO mice (mean  $\pm$  SEM). Two-way ANOVA tests revealed no significant differences between Control and *Yap* CKO mice.

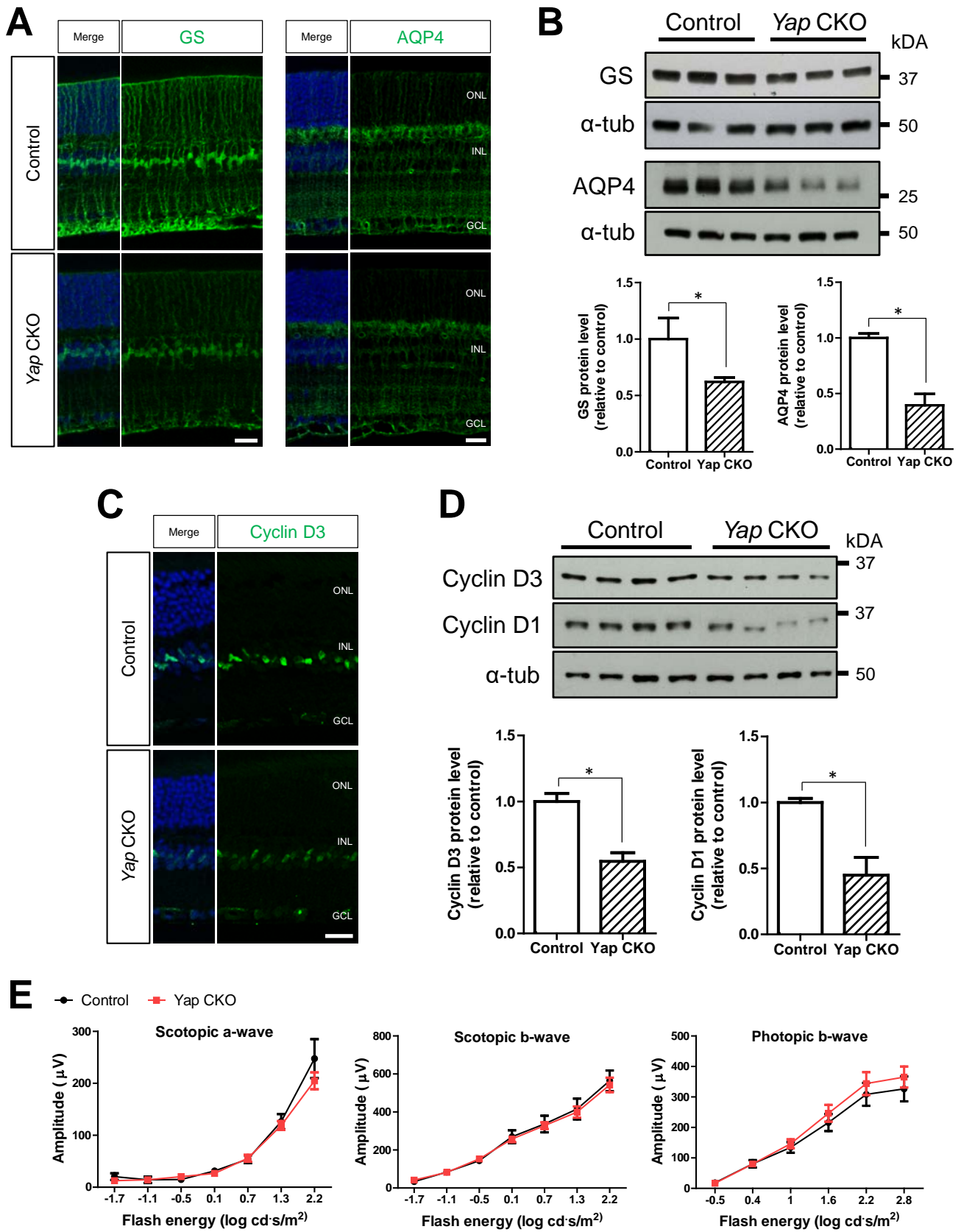


Figure 4

**Figure 5: Yap CKO old mice show Müller cell gliosis and visual defects.**

**(A)** Diagram of the experimental procedure shown in B-D. *Yap<sup>flox/flox</sup>* mice (Control) and *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>* (*Yap* CKO) mice received a single dose of 4-OHT at P10 and were analyzed at the age of 9 months. **(B,C)** Retinal sections from Control and *Yap* CKO mice immunostained with anti-GS (B) or anti-GFAP (C) antibodies. Nuclei are labeled with DAPI. ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bar: 20  $\mu$ m. **(D)** Western-blot of retinal protein extracts from three Control and three *Yap* CKO mice probed with anti-GFAP antibody or anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) antibody as a loading control. The histogram represents GFAP quantification from western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin and relative to controls. Mean values  $\pm$  SEM are shown. \* indicates p-value  $\leq$  0.05 (Mann-Whitney test). **(E)** Intensity response curves of the average scotopic a-wave, scotopic b-wave and photopic b-wave responses of twelve Control and eleven *Yap* CKO mice (mean  $\pm$  SEM) are shown. Two-way ANOVA tests revealed no significant differences between Control and *Yap* CKO mice for scotopic b-wave and scotopic a-wave but significant decrease of photopic b-wave (p=0.0126) in *Yap* CKO mice compared to Control ones.

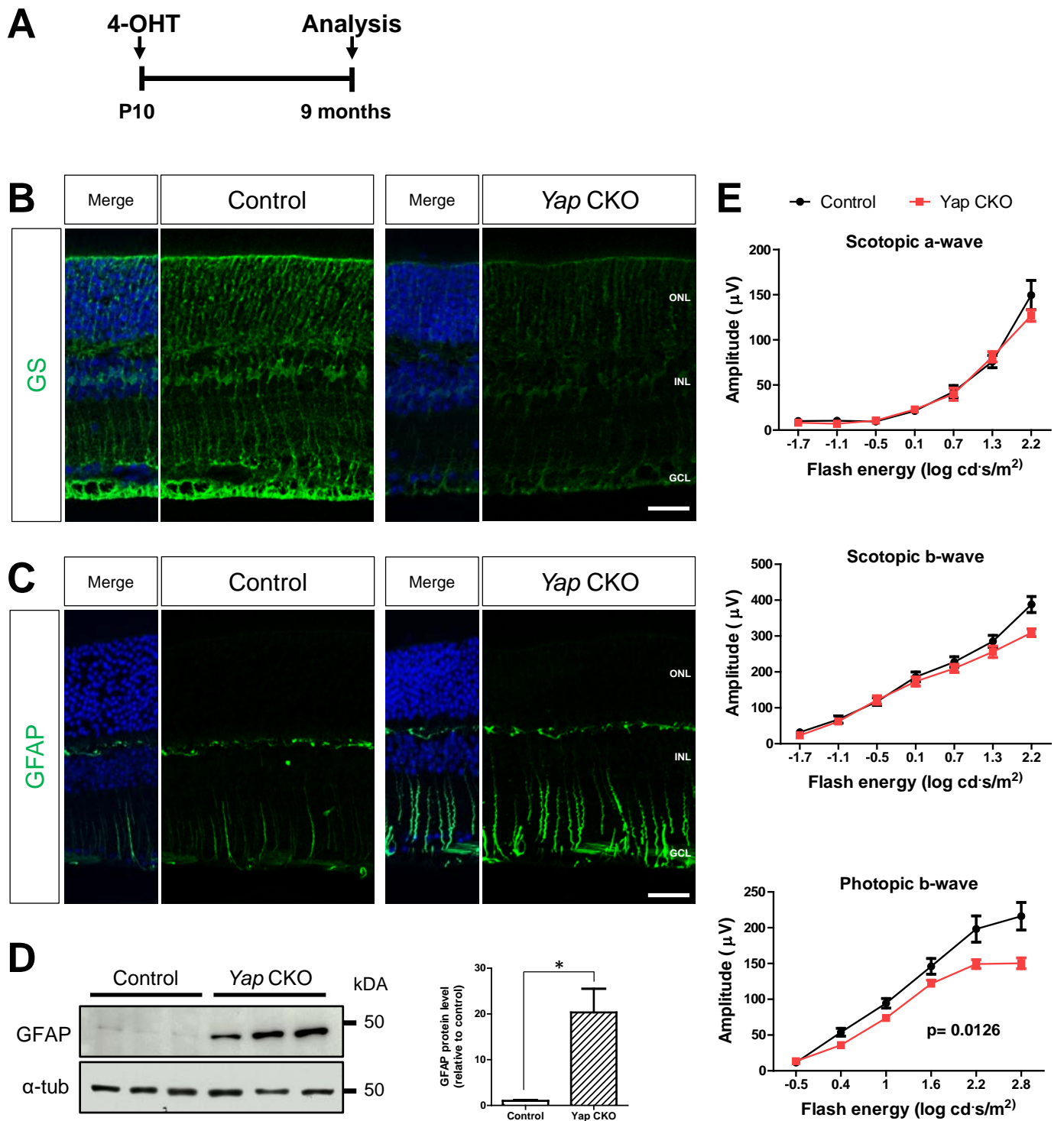


Figure 5

**Figure 6: Yap CKO mice show an aberrant increase of retinal reactive gliosis in response to MNU injection.**

**(A)** Diagram of the experimental procedure shown in B-C. *Yap<sup>flox/flox</sup>* mice (Control) and *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>* (*Yap* CKO) mice received a single dose of 4-OHT at P10, a single dose of MNU at 2 months and were analyzed 16 hours after MNU injection. **(B)** Western-blot images of retinal protein extracts from non-injected Control mice (Control), Control mice injected with MNU (Control + MNU) and *Yap* CKO mice injected with MNU (*Yap* CKO + MNU), probed with anti-YAP antibody or anti-TAZ antibody and anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) as a loading control. Histograms represent YAP and TAZ quantification from western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin and relative to non-injected controls. Mean values  $\pm$  SEM are shown. \* indicates p-value  $\leq$  0.05 (Mann-Whitney test). The significance of YAP level increase between Control and Control + MNU was not evaluated here since the experiment was performed on only two samples for the Control condition. **(C)** Retinal sections from Control, Control + MNU and *Yap* CKO + MNU mice immunostained with anti-GFAP antibody. Nuclei are labeled with DAPI (blue). The regions delineated with dashed lines are enlarged in the lower panels. ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bars: 20  $\mu$ m.

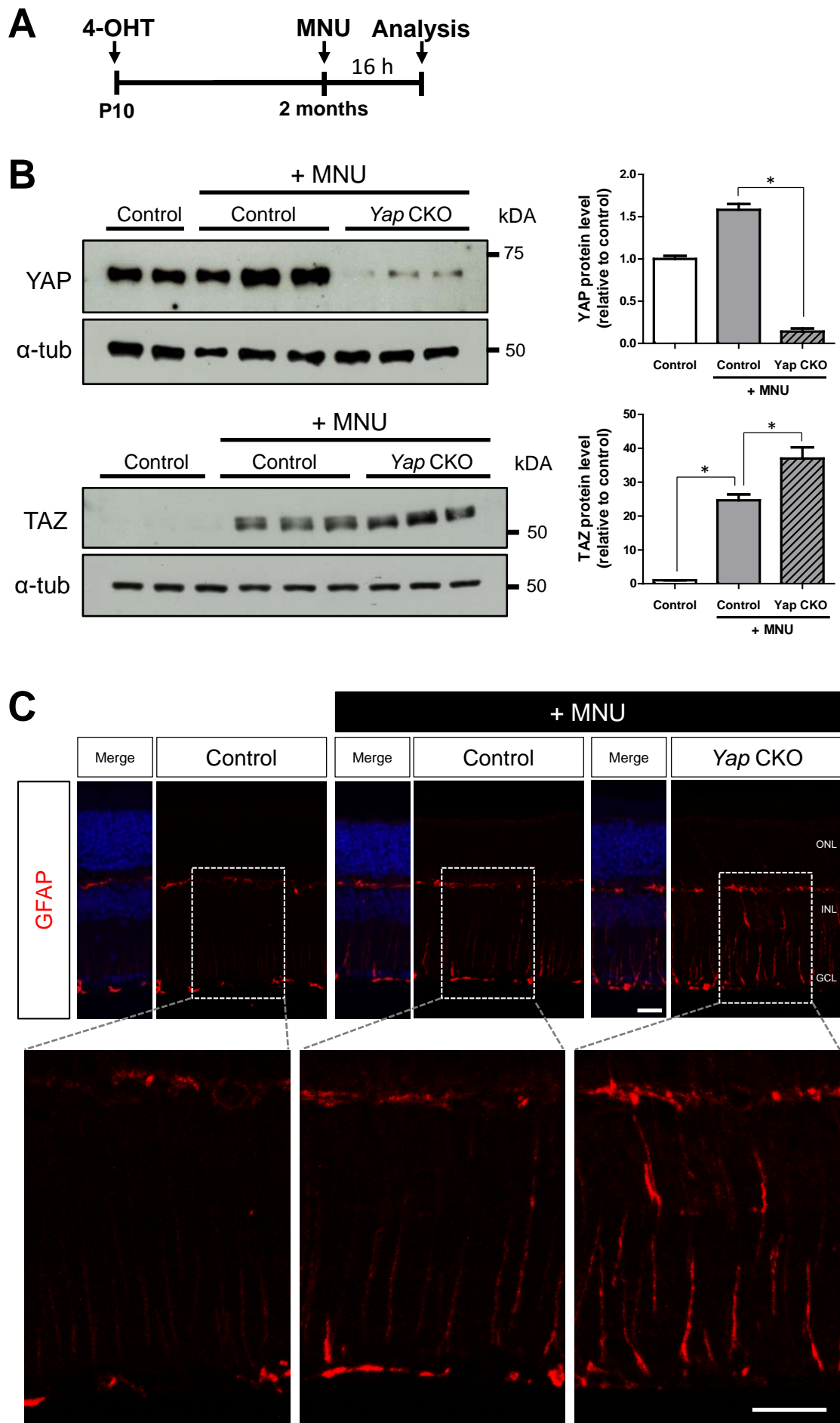


Figure 6

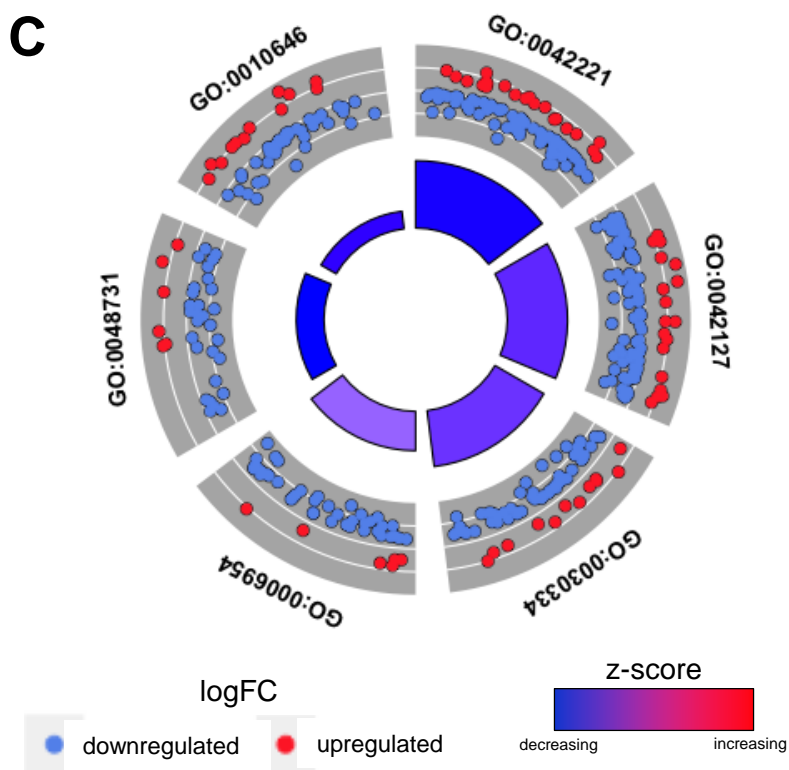
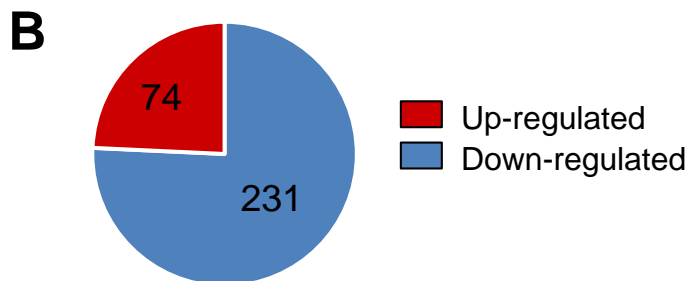


**Figure 7: Whole transcriptome analysis of *Yap* CKO retinas following MNU injection.**

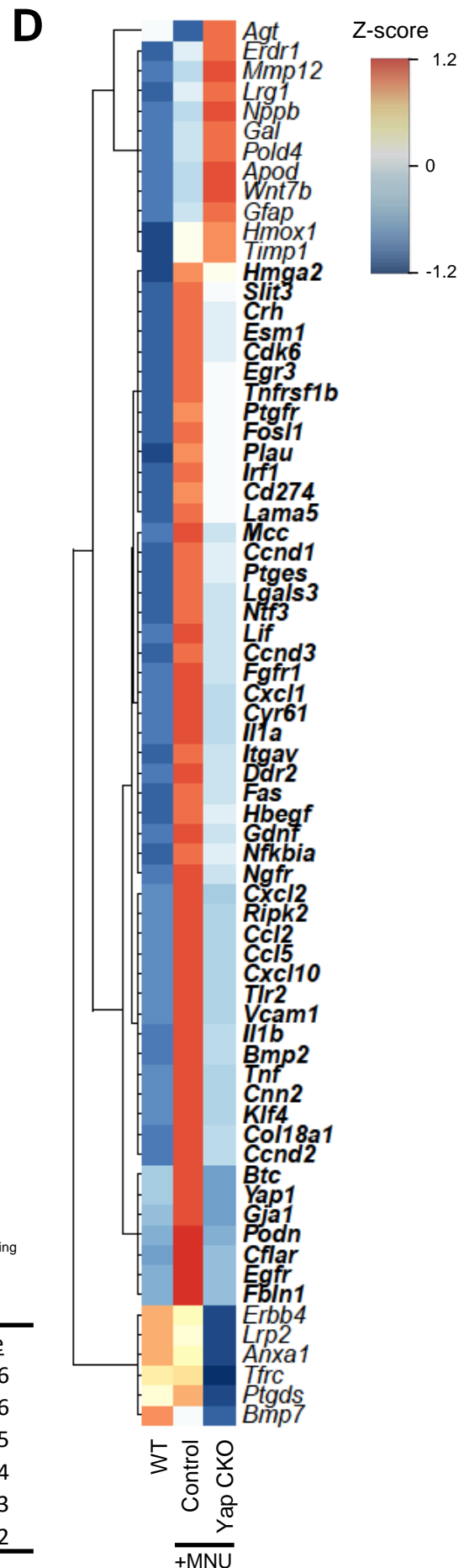
**(A)** Whole transcriptome sequencing analysis, from wild-type non injected mice (WT) or *Yap<sup>flox/flox</sup>* (Control) and *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>* (*Yap* CKO) mice injected with 4-OHT and MNU as shown in Figure 6A, was performed using a FPKM filtering cutoff of 1 in at least one of the samples. A *p-value* (*pval*)  $\leq 0.05$  was considered significant and a cutoff of a fold change (FC) of 1.5 was applied to identify differentially expressed genes (DEGs). The table shows numbers of DEGs between the conditions. **(B)** Pie chart representing the proportion of up-and down-regulated DEGs in MNU injected-*Yap* CKO mice compared to MNU injected-Control mice following MNU injection. **(C)** Circular visualization of Gene Ontology (GO) enrichment analysis: six over-represented GO Biological Processes (BP), related to retinal response to injury, among the top twenty over-represented GO BP identified by GO enrichment analysis generated by PANTHER. Down-regulated genes (blue dots) and up-regulated genes (red dots) within each GO BP are plotted based on logFC. Z-score bars indicate if an entire biological process is more likely to be increased or decreased based on the genes within it. The table shows GO identity number (ID) depicted on the circle, associated GO terms and p-value. **(D)** Hierarchical clustering analysis of the 70 DEGs from the GO BP “regulation of cell proliferation” (GO:0042127) and the resulting heatmap representing the z-score expression values for each condition. Genes in bold are those that are (i) expressed at very low levels in non-injected mice, (ii) strongly upregulated in MNU injected mice, while (iii) only moderately enriched in MNU injected *Yap* CKO mice.

**A** FPKM  $\geq 1$ ; pval  $\leq 0.05$ ; FC = 1.5

Analysis	DEGs
WT vs Control + MNU	4,900
Control + MNU vs Yap CKO + MNU	305



ID	Biological Process GO term	P-Value
GO:0042221	response to chemical	1.32E-16
GO:0042127	regulation of cell proliferation	5.50E-16
GO:0030334	regulation of cell migration	1.20E-15
GO:0006954	inflammatory response	3.65E-14
GO:0048731	system development	3.80E-13
GO:0010646	regulation of cell communication	2.86E-12



**Figure 7**

**Figure 8: *Yap* CKO mice show reduced cell cycle gene upregulation in response to MNU injection.**

**(A)** Histogram representations of relative RNA expression (in FPKM) of *Ccnd1*, *Ccnd2*, *Ccnd3* and *Cdk6* genes obtained from RNA-sequencing data from wild-type non injected mice (WT) or *Yap<sup>flox/flox</sup>* (Control) and *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>* (*Yap* CKO) mice injected with 4-OHT and MNU as shown in Figure 6A. Mean values  $\pm$  SEM are shown. \*\* indicates p-value  $\leq$  0.01; \*\*\* indicates p-value  $\leq$  0.001. **(B)** Histogram representation of relative mRNA expression of *Ccnd1* and *Ccnd3*, obtained by RT-qPCR analysis, relative to controls. Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM from at least five biological replicates per condition. The data were normalized against the geometric average  $\Delta$ Ct of 3 housekeeping genes (*Tbp*, *Srp72*, *Rps26*). **(C)** Retinal sections, from Control and *Yap* CKO mice injected with MNU, immunostained with anti-Cyclin D1 or anti-Cyclin D3 antibodies. Nuclei are labeled with DAPI (blue). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bar: 20  $\mu$ m. **(D)** Western-blot of retinal protein extracts from non-injected Control mice, or Control and *Yap* CKO mice injected with MNU, probed with anti-Cyclin D1 and anti-Cyclin D3 antibodies or anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) as a loading control. Histograms represent Cyclin D1 and Cyclin D3 quantification from western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin and relative to non-injected controls. Mean values  $\pm$  SEM are shown. \* indicates p-value  $\leq$  0.05 (Mann-Whitney test).

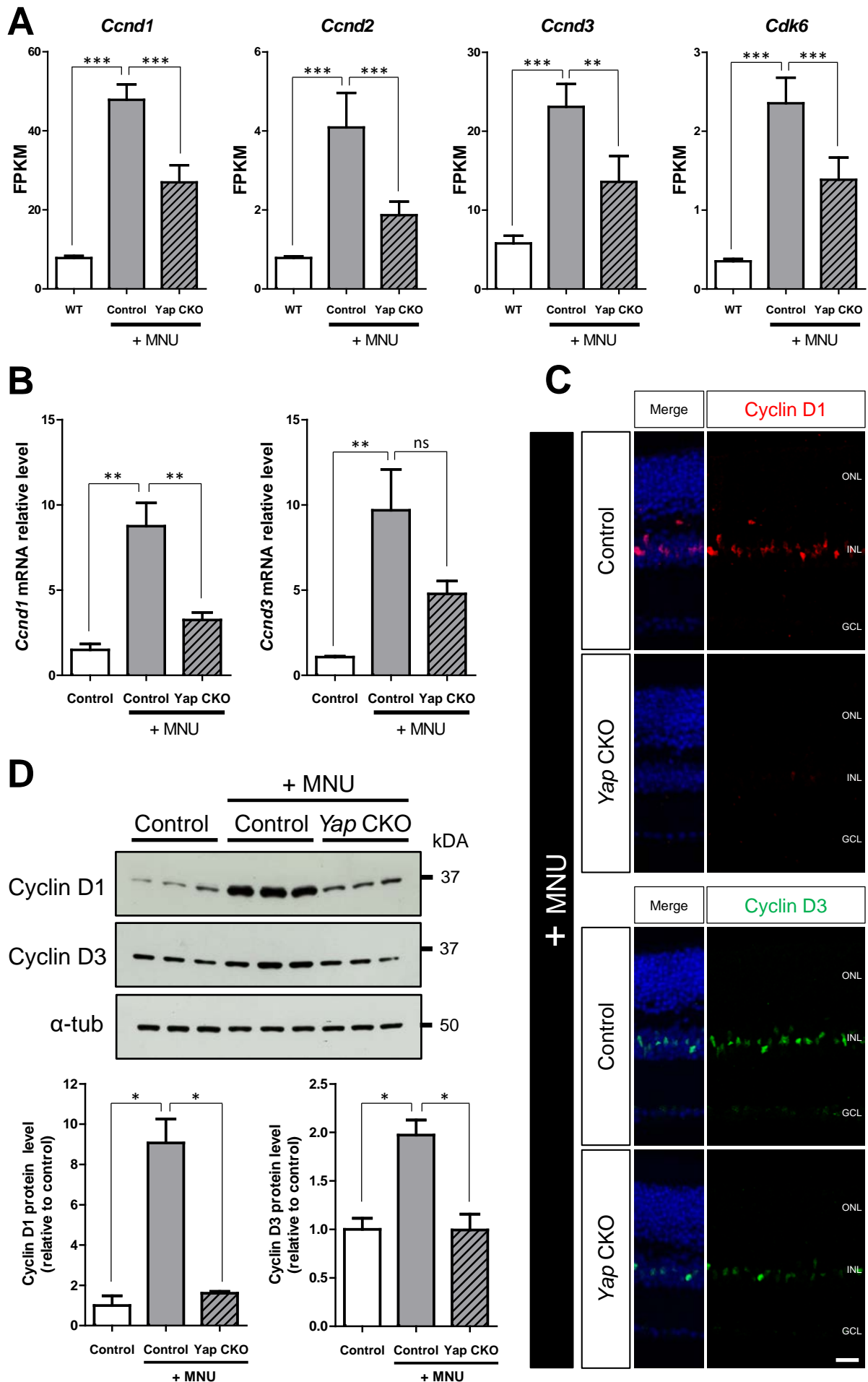


Figure 8

**Figure 9: *Yap* CKO mice show decreased expression of EGFR pathway components and decreased EGFR signaling activity.**

**(A)** Histogram representation of relative RNA expression (in FPKM) of *Egfr*, *ErbB4*, *Hbegf* and *Nrg1* genes obtained from RNA-sequencing data from wild-type non injected mice (WT) or *Yap<sup>flox/flox</sup>* (Control) and *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>* (*Yap* CKO) mice injected with 4-OHT and MNU as shown in Figure 6A. Mean values  $\pm$  SEM are shown. \*\* and \*\*\* indicate respectively p-value  $\leq$  0.01 and p-value  $\leq$  0.001. ns: non-significant.

**(B)** Western-blot of retinal protein extracts from non-injected Control mice or Control and *Yap* CKO mice injected with MNU, probed with anti-P-ERK, anti-ERK, anti-P-AKT, anti-AKT antibodies and anti- $\alpha$ -tubulin ( $\alpha$ -tub) as a loading control. Histograms represent P-ERK/ERK and P-AKT/AKT ratio quantification from western-blot signals normalized to  $\alpha$ -tubulin and relative to non-injected controls. Mean values  $\pm$  SEM are shown. \* indicates p-value  $\leq$  0.05; ns: non-significant (Mann-Whitney test). **(C)** Retinal sections, from Control and *Yap* CKO mice injected with MNU, immunostained with anti-P-ERK antibody. Nuclei are labeled with DAPI (blue). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bar: 20  $\mu$ m.

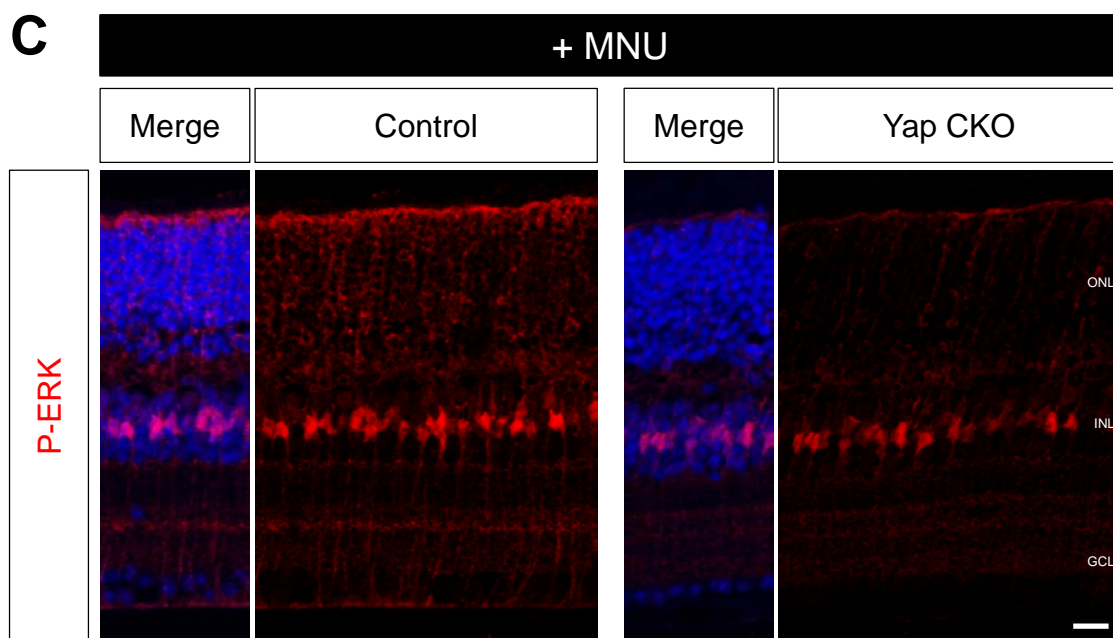
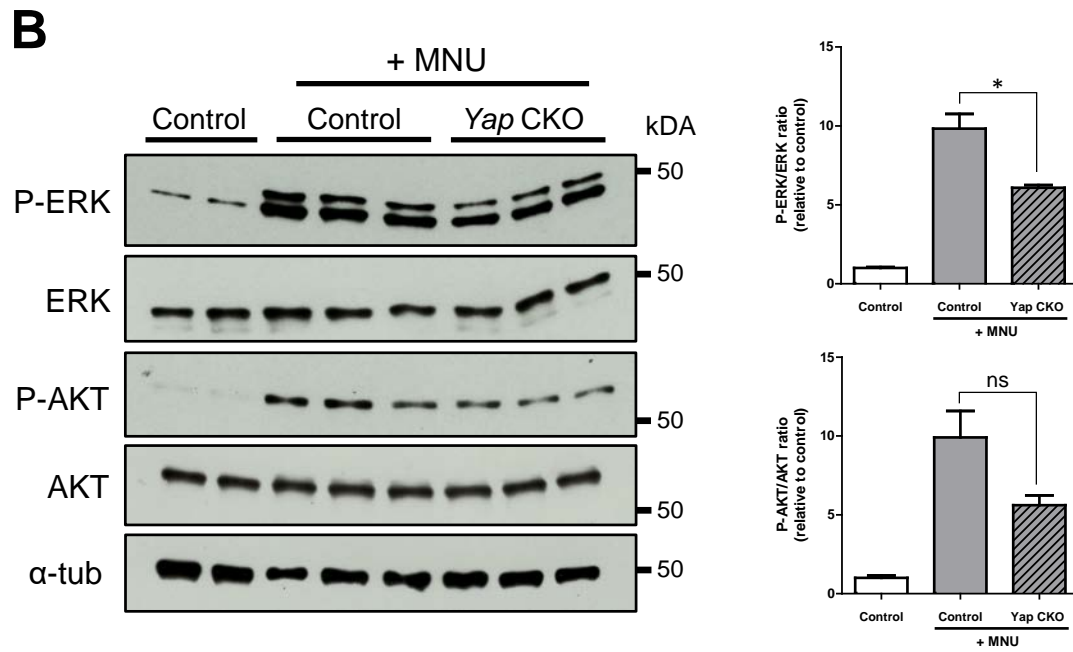
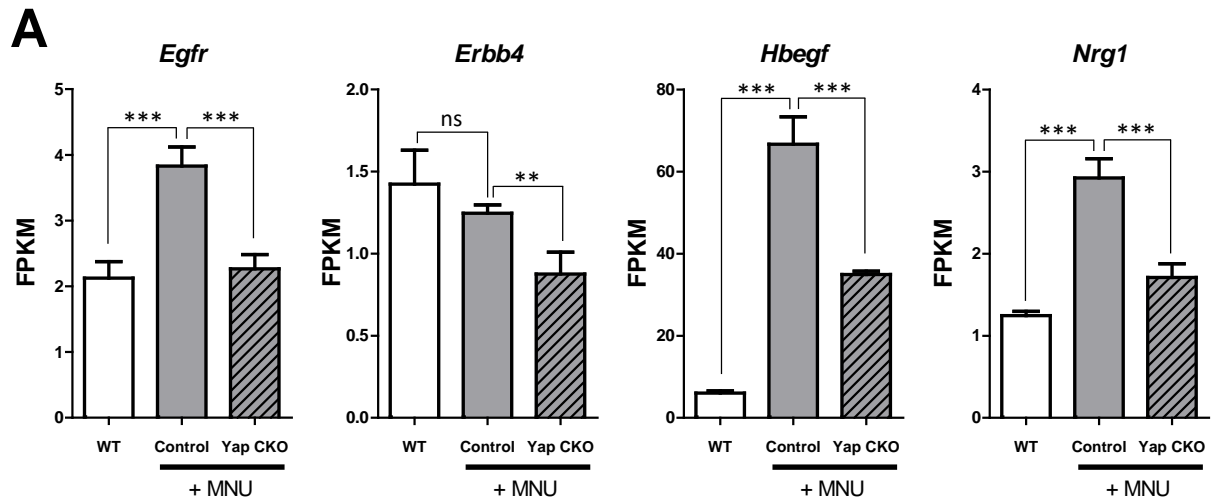
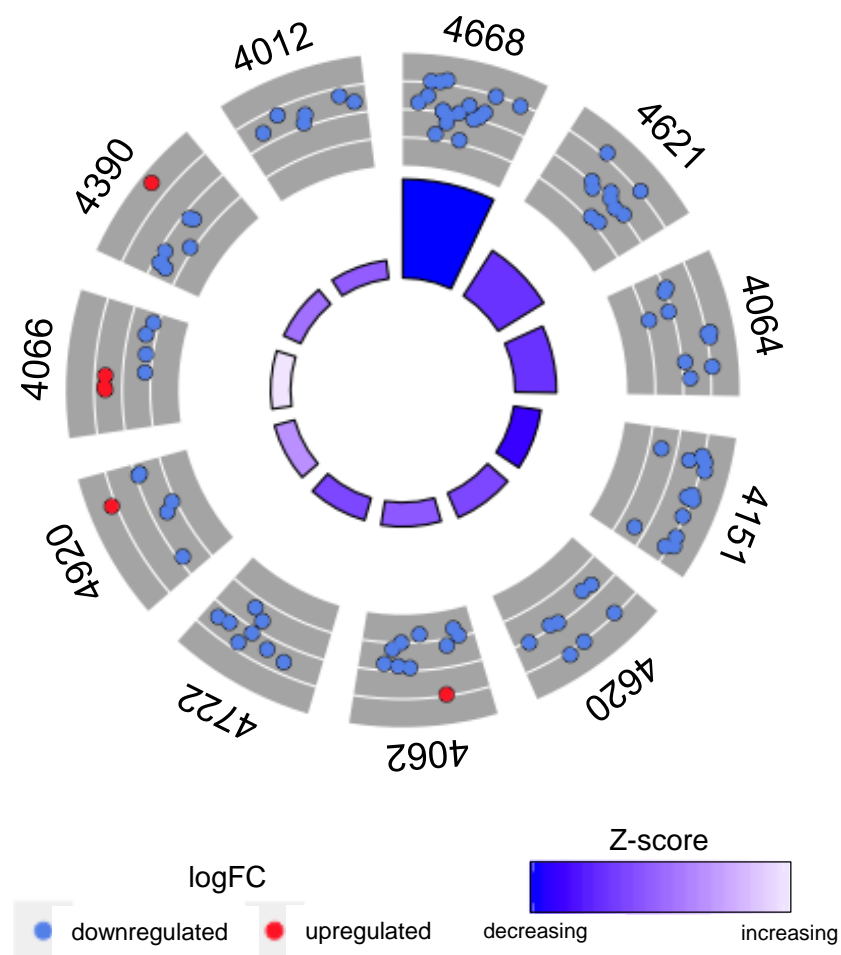


Figure 9

**Figure 10: Deregulated signaling pathways in Yap CKO in response to MNU injection.**

**(A)** Circular visualization of pathway analysis from RNA-seq data from wild-type non injected mice (WT) or *Yap<sup>flox/flox</sup>* (Control) and *Yap<sup>flox/flox</sup>;Rax-CreER<sup>T2</sup>* (*Yap* CKO) mice injected with 4-OHT and MNU as shown in Figure 6A: eleven deregulated signaling pathways among the significantly deregulated pathways identified by Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) enrichment analysis. Down-regulated genes (blue dots) and up-regulated genes (red dots) within each signaling pathway are plotted based on logFC. Z-score bars indicate if an entire signaling pathway is more likely to be increased or decreased based on the genes within it. The table shows pathway identity number (ID) depicted on the circle, associated pathway name, gene count and False Discovery Rate (FDR).



ID	Pathway	Gene count	FDR
4668	TNF signaling pathway	18	4.85E-13
4621	NOD-like receptor signaling pathway	10	2.09E-07
4064	NF-kappa B signaling pathway	10	6.75E-06
4151	PI3K-Akt signaling pathway	15	0.000389
4620	Toll-like receptor signaling pathway	8	0.000464
4062	Chemokine signaling pathway	10	0.000945
4722	Neurotrophin signaling pathway	8	0.00126
4920	Adipocytokine signaling pathway	6	0.00251
4066	HIF-1 signaling pathway	7	0.00337
4390	Hippo signaling pathway	8	0.00458
4012	ErbB signaling pathway	6	0.00492

Figure 10



**Figure 11: Schematic cartoon showing the proposed model for the implication of the YAP-EGFR axis in Müller glia cell cycle re-entry in response to injury.**

Our results support the existence of a connection between YAP and the EGFR pathway in regulating Müller glia cell-cycle re-entry upon injury. In particular, our data suggest that YAP regulates the expression of EGFR signaling receptors (EGFR and ERBB4) and ligands (HBEGF and NRG1). Moreover, on the basis of other's findings showing that YAP activity is regulated by EGFR pathway (Reddy and Irvine, 2013; Haskins et al., 2014; Sudol, 2014; Yan et al., 2017), we propose that YAP may be involved in a positive feedback loop to regulate Müller cell response to injury. YAP may also impact Müller glia quiescent exit through direct regulation of cell cycle genes, such as those encoding proteins of the Cyclin D-CDK complex. Green and red arrows represent positive and negative regulation, respectively.

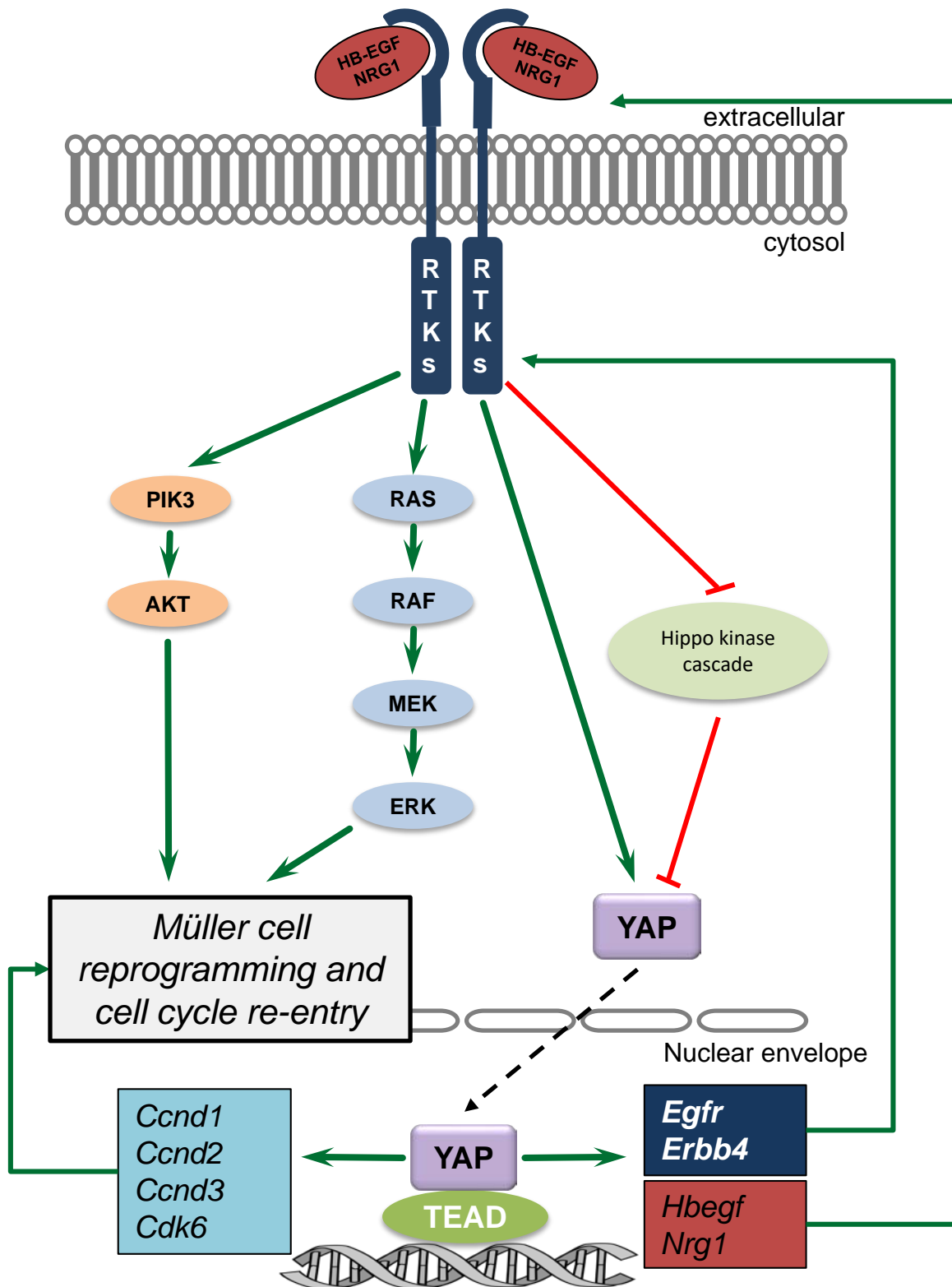
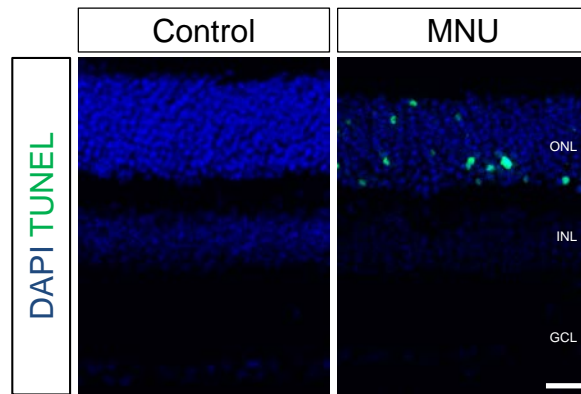


Figure 11

**Supplementary Figure 1: Photoreceptor degeneration 16 hours after MNU injection.**

TUNEL assay (green) performed on retinal sections of non-injected wild type mice (control) and MNU injected-wild type mice. Nuclei are labeled with DAPI (blue). ONL: outer nuclear layer; INL: inner nuclear layer; GCL: ganglion cell layer. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .



**Supplementary Figure 1**

**Supplementary Table 1: List of the top twenty over-represented GO Biological Processes.**

Top twenty over-represented GO BP identified by GO enrichment analysis of the RNAseq dataset from MNU injected-wild-type mice and MNU injected-Yap CKO mice as generated by PANTHER.

<u>GO Biological Process</u>	<u>Gene count</u>	<u>Expected</u>	<u>Fold Enrichment</u>	<u>P-Value</u>
regulation of multicellular organismal process	101	36.14	2.79	7.54E-19
response to chemical	107	42.87	2.5	1.32E-16
regulation of cell proliferation	70	20.42	3.43	5.50E-16
regulation of cell migration	48	9.79	4.9	1.20E-15
regulation of cellular component movement	51	11.33	4.5	2.63E-15
response to external stimulus	71	21.71	3.27	3.53E-15
regulation of cell motility	48	10.3	4.66	8.83E-15
cellular response to chemical stimulus	77	25.95	2.97	1.91E-14
response to stimulus	172	99.4	1.73	2.34E-14
inflammatory response	35	5.38	6.5	3.65E-14
negative regulation of multicellular organismal process	56	14.77	3.79	7.77E-14
regulation of locomotion	48	11.29	4.25	3.12E-13
positive regulation of biological process	136	70.3	1.93	3.59E-13
system development	112	51.46	2.18	3.80E-13
positive regulation of cell proliferation	48	11.55	4.16	7.47E-13
positive regulation of multicellular organismal process	66	21.19	3.12	9.42E-13
anatomical structure development	125	62.56	2	1.58E-12
response to organic substance	79	29.41	2.69	1.71E-12
developmental process	130	66.8	1.95	2.07E-12
regulation of cell communication	90	36.99	2.43	2.86E-12

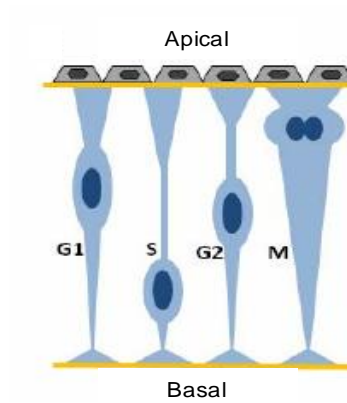
## Supplementary Table 1

**Supplementary Table 2: List of primary and secondary antibodies used for immunohistochemistry and western-blot.**

Antigene	Host	Supplier	Reference	Dilution (IHC)	Dilution (WB)
<b>Primary antibodies</b>					
<b>AKT</b>	mouse	SIGMA	P2482		1:1,000
<b>Alpha-tubulin</b>	mouse	SIGMA	T5168		1:10,000
<b>AQP4</b>	rabbit	Alomone labs	AQP4-004	1:200	1:500
<b>Arrestin</b>	rabbit	EMD Millipore	AB15282	1:1,000	
<b>Brn3a</b>	mouse	Santa Cruz	sc-8429	1:100	
<b>Calbindin D-28k</b>	rabbit	Swant	300	1:100	
<b>Calretinin</b>	mouse	EMD Millipore	MAB1568	1:1,000	
<b>Cyclin D1</b>	rabbit	Abcam	ab134175	1:100	1:1,000
<b>Cyclin D3</b>	mouse	Cell Signaling	2936	1:100	1:1,000
<b>ERK1/2 (p44/42 MAPK)</b>	rabbit	Cell Signaling	9102		1:1,000
<b>GFAP</b>	rabbit	Dako	Z0334	1:500	
<b>GFAP</b>	goat	Abcam	ab53554		1:5,000
<b>Glutamine synthetase</b>	mouse	Abcam	ab64613	1:1,500	1:10,000
<b>Lectin PNA alexa 568 conjugate</b>	peanut	Thermo Fisher Scientific	L32458	1:500	
<b>P-AKT (Ser473)</b>	rabbit	Cell Signaling	9271		1:1,000
<b>P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)</b>	rabbit	Cell Signaling	4370	1:100	1:1,000
<b>Red Fluorescence Protein</b>	rabbit	Rockland	600-401-379	1:100	
<b>Rhodopsin</b>	mouse	EMD Millipore	MAB5316	1:2,000	
<b>S-opsin</b>	rabbit	EMD Millipore	AB5407	1:500	
<b>Sox9</b>	rabbit	EMD Millipore	AB5535	1:300	
<b>TAZ</b>	rabbit	Abcam	ab110239		1:1,000
<b>Vimentin</b>	rabbit	Santa Cruz	sc-7557	1:200	
<b>YAP</b>	mouse	Abcam	ab56701	1:50	1:1,000
<b>Secondary antibodies</b>					
<b>Alexa 488 anti-mouse IgG1</b>	goat	Thermo Fisher Scientific	A21121	1:500	
<b>Alexa 488 anti-rabbit</b>	donkey	Thermo Fisher Scientific	A21206	1:500	
<b>Alexa 555 anti-mouse IgG1</b>	goat	Thermo Fisher Scientific	A21127	1:500	
<b>Alexa 555 anti-mouse IgG2b</b>	goat	Thermo Fisher Scientific	A21147	1:500	
<b>Alexa 555 anti-mouse IgG2a</b>	goat	Thermo Fisher Scientific	A21127	1:500	
<b>Alexa 555 anti-rabbit</b>	donkey	Thermo Fisher Scientific	A31572	1:500	
<b>HRP anti-mouse IgG</b>	goat	Sigma-Aldrich	A4416		1:5,000
<b>HRP anti-rabbit IgG</b>	donkey	GE Health	NA934V		1:5,000
<b>HRP anti-goat IgG</b>	rabbit	Sigma-Aldrich	A5520		1:5,000

**Supplementary Table 2**





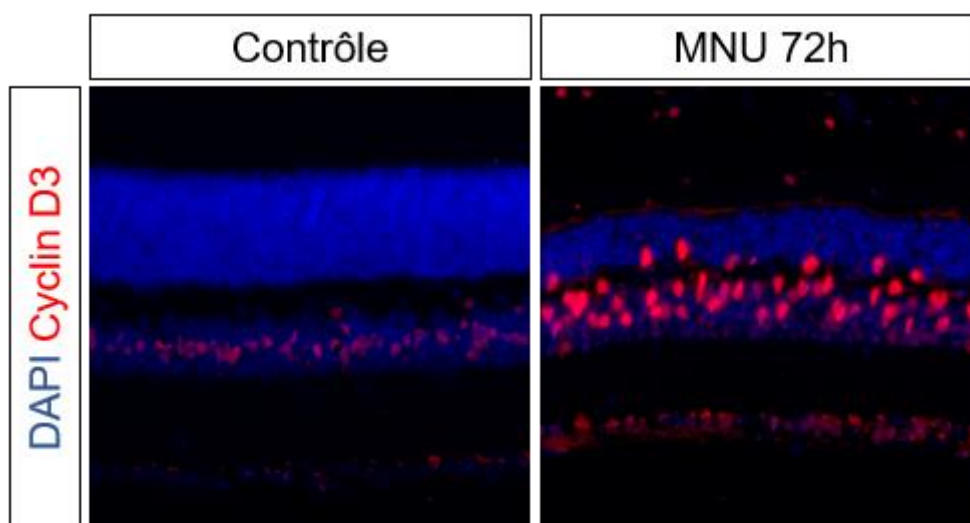
**Figure 50 : Schéma représentant la migration nucléaire intercinétique des progéniteurs rétiniens.** Au cours de la division cellulaire, les noyaux des progéniteurs migrent selon la phase du cycle. Ils répliquent leur ADN au niveau de la surface basale tandis qu'ils entrent en mitose au niveau de la surface apicale. D'après (Messina et al 2011).

### III. POURSUITE DU PROJET

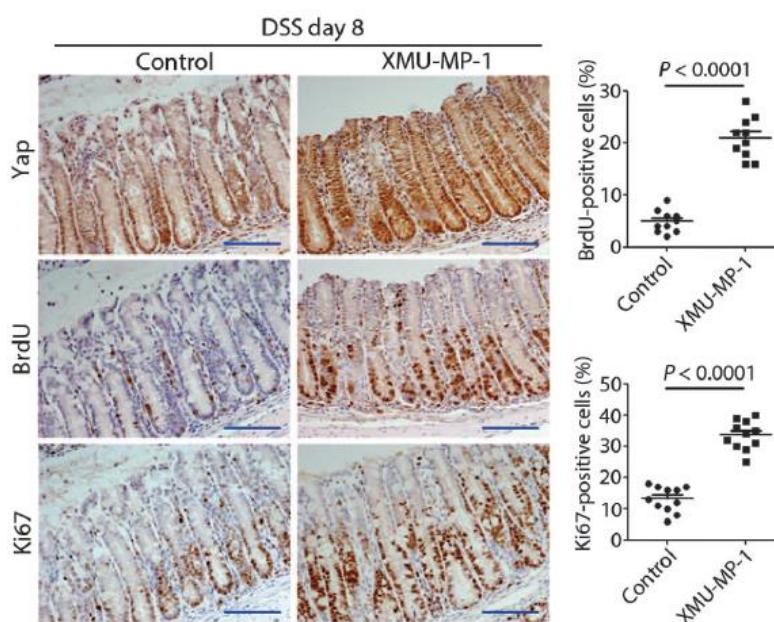
Nous souhaitons, avant la soumission pour publication du deuxième article que je présente dans ce manuscrit de Thèse, réaliser quelques expériences supplémentaires pour renforcer nos conclusions et compléter le modèle proposé. Pour cette raison, j'ai décidé de présenter les expériences que j'ai prévues de réaliser dans les mois qui viennent puisque j'ai la chance de pouvoir rester au laboratoire pour poursuivre ce projet de recherche pendant encore un an. Ces expériences vont être réalisées en collaboration avec Diana García García, étudiante en première année de thèse que j'ai co-encadrée pendant son stage de Master2.

#### 1. Etude de l'impact de la perte de *Yap* sur la prolifération des cellules de Müller en condition de dégénérescence *in vivo* et *ex vivo*

Après avoir mis en évidence l'implication de YAP dans la réponse précoce des cellules de Müller à la mort des photorécepteurs et plus particulièrement dans leur sortie de quiescence via l'expression de gènes du cycle cellulaire, nous voulons analyser l'impact de la perte de *Yap* sur le comportement prolifératif des cellules de Müller en condition de dégénérescence. Dans cette optique, nous sommes confrontés à certaines limites de notre modèle d'étude. En effet, si les cellules de Müller sont capables de proliférer *in vivo* chez le rat suite à une injection de MNU, ce n'est pas le cas chez la souris (Nomura-Komoike et al. 2016). Cependant, bien qu'elles ne prolifèrent pas *in vivo*, les cellules de Müller réactivées suite à l'injection de MNU entament une migration nucléaire intercinétique semblable à celle des progéniteurs rétiniens au cours du développement (Messina et al. 2011) (Figure 50). Cette migration des noyaux des cellules de Müller n'a pas beaucoup été étudiée chez la souris. En revanche, chez le poisson-zèbre, elle a été décrite comme étant une des premières étapes de l'entrée en prolifération des cellules de Müller. Leurs noyaux migrent en effet vers le pôle apical de la rétine à savoir la couche nucléaire externe pour entrer en mitose (Bernardos et al. 2007; Lahne et al. 2013; Nagashima et al. 2013). Chez la souris, cette première étape de migration des noyaux intervient malgré le fait que le processus de prolifération semble ensuite être stoppé. Sachant que mes travaux ont montré que la perte de *Yap* dans les cellules de Müller inhibe l'augmentation de l'expression des gènes du cycle cellulaire et réduit l'activité de la voie EGF dans ces cellules en contexte de dégénérescence des photorécepteurs, on se demande si cela pourrait également affecter leur migration intercinétique nucléaire. Nous allons donc quantifier la migration des noyaux des cellules de Müller (pourcentage de noyaux ayant quitté la couche nucléaire interne) chez des souris *Yap* CKO et contrôles 72 h après



**Figure 51: Migration des noyaux des cellules de Müller dans le modèle de dégénérescence induite par le MNU.** Immunomarquages à l'aide d'un anticorps anti-Cycline D3 sur des coupes de rétines issues de souris C57B6/J adultes ayant reçues des injections intrapéritonéales de solution saline (Contrôle) ou de MNU. Les souris ont été sacrifiées 72 h après l'injection. Les noyaux sont également marqués avec du DAPI pour visualiser la lamination rétinienne.



**Figure 52: Le XMU-MP-1 promeut la prolifération des cellules des cryptes intestinales après une lésion sévère du colon.** Immunomarquages à l'aide d'anticorps anti-YAP, anti-BrdU et anti-Ki67 sur coupes de colon issues de souris sauvages injectées avec du DSS pour induire la dégénérescence et traitées ou non avec du XMU-MP-1 (1 mg/kg par jour pendant 7 jours). Les quantifications du nombre de cellules BrdU et Ki67 positives sont présentées à droite. Les moyennes  $\pm$  l'écart-type sont représentées (n=10). Les souris traitées avec du XMU-MP-1 présentent une augmentation de l'expression de YAP dans les cryptes intestinales en comparaison aux contrôles ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules en prolifération (cellules Ki67 + et BrdU +). D'après (Fan et al 2016).

injection de MNU. Ce temps a été choisi car nous savons qu'à ce moment-là les noyaux des cellules de Müller ont déjà commencé à migrer chez les souris sauvages (Figure 51).

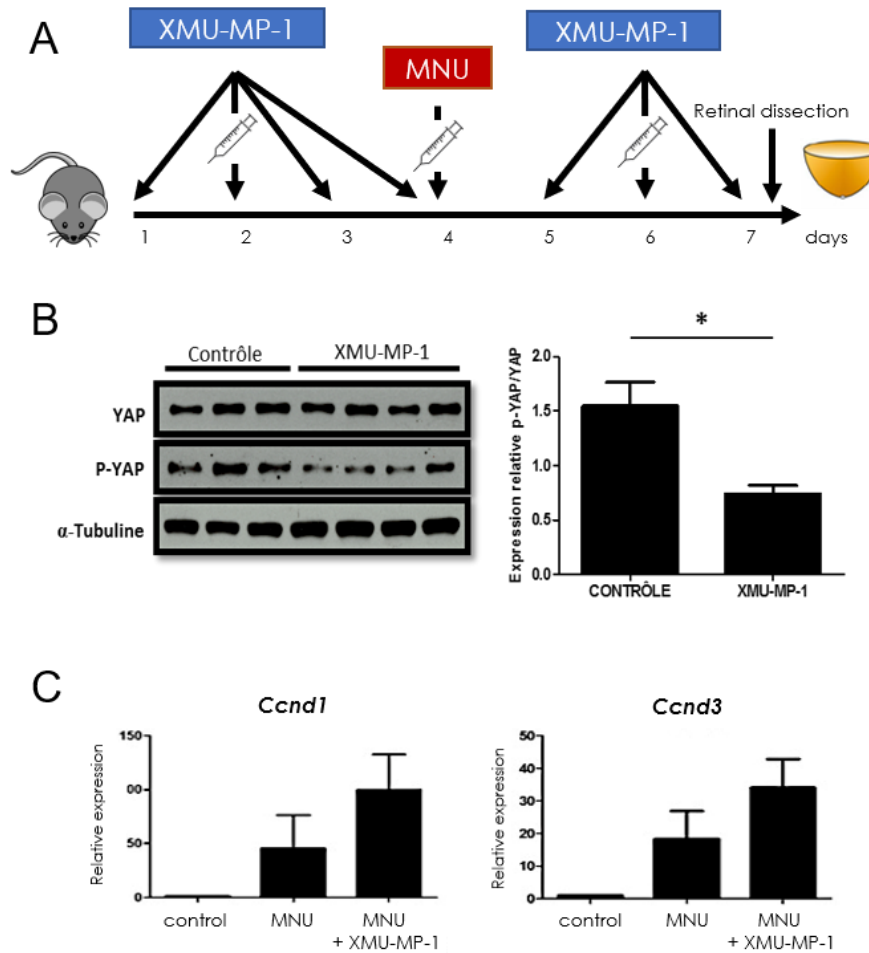
Cette expérience sera donc intéressante pour voir si les modifications moléculaires que j'ai mises en évidence ont un impact sur le comportement des cellules de Müller réactives en réponse à la mort des photorécepteurs.

Par ailleurs, une solution pour étudier la prolifération des cellules de Müller est de réaliser des expériences sur explants rétiniens en culture. L'explant rétinien est un modèle de dégénérescence spontanée dans lequel les photorécepteurs commencent à mourir après quelques jours de culture (Müller et al. 2017). Dans ce modèle *ex vivo*, avec un milieu de culture favorable, les cellules de Müller de souris sont capables de proliférer en réponse à la dégénérescence (Suga et al. 2014; Ueki & Reh 2013; Y. Ueki et al. 2015). Nous allons donc mettre en culture des rétines provenant de souris contrôles et *Yap* CKO et comparer la prolifération des cellules de Müller dans ces deux conditions. Cette expérience permettra donc d'évaluer si l'absence de YAP dans les cellules de Müller les empêche d'entrer en prolifération *ex vivo*.

## 2. Etude de l'impact de la suractivation de *Yap* sur la réponse des cellules de Müller en condition de dégénérescence

Nous souhaitons renforcer nos résultats obtenus en perte de fonction de *Yap* en réalisant également des expériences de gain de fonction. Nous voulons en effet étudier l'impact de la suractivation de YAP sur la réponse des cellules de Müller réactives. Pour augmenter l'activité de YAP dans les cellules de Müller, nous allons utiliser un agent pharmacologique nommé XMU-MP-1. Cette drogue est un inhibiteur sélectif des kinases MST1/2 (Fan et al. 2016). Par conséquent, elle inhibe l'activation de la voie Hippo, donc la phosphorylation de YAP, permettant ainsi sa translocation au noyau et son interaction avec le facteur de transcription TEAD et donc l'expression des gènes cibles. Il a été montré que cette drogue agit comme un stimulant de la prolifération cellulaire, de la réparation tissulaire et de la régénération dans des modèles de dommages intestinaux et hépatiques (Figure 52) (Fan et al. 2016).

Nous allons donc utiliser le XMU-MP-1 pour augmenter l'activité de YAP dans la rétine dans le modèle de dégénérescence induite par le MNU. Nous allons ensuite étudier l'expression des gènes cibles potentiels de YAP que nous avons trouvé diminués dans les souris *Yap* CKO par rapport aux contrôles, à savoir les gènes associés au cycle cellulaire (*Ccnd1-3*, *Cdk6*) et à la voie de signalisation EGFR (*Egfr*, *ErbB4*, *Hbegf*, *Nrg1*) afin de renforcer l'idée d'une régulation directe de ces gènes par YAP. Nous



**Figure 53: Résultats préliminaires d'expériences de suractivation de YAP.** (A). Représentation schématique du protocole utilisé pour les expériences de suractivation de YAP in vivo. (B). Analyse par western blot de l'état de phosphorylation de la protéine YAP (anticorps anti-YAP et anti-P-YAP), à partir d'extraits protéiques de rétines issues de souris C57B6/J adultes. La tubuline sert de contrôle de charge. L'histogramme présente la quantification du ratio des signaux P-YAP/YAP obtenus en western blot, normalisés par rapport aux signaux de l' $\alpha$ -tubuline. Les valeurs moyennes obtenues à partir de 3 ou 4 rétines par condition  $\pm$  SEM sont représentées. L'astérisque indique une valeur de  $p \leq 0,05$  (test de Mann-Whitney). (C). Expression relative de *Ccnd1* et *Ccnd3* obtenue par RT-qPCR.

regarderons également l'impact de la suractivation de YAP sur l'activation des voies MAPK et PI3K/AKT. Nous avons déjà des résultats préliminaires qui suggèrent que l'injection de XMU-MP-1 permet de réduire la phosphorylation de YAP suggérant une augmentation de la forme nucléaire et donc de l'activité de YAP. Les résultats préliminaires montrent également une tendance à l'augmentation de l'expression des gènes *Ccnd1* et *Ccnd3* (Figure 53). Ces résultats préliminaires doivent être confirmés sur un nombre d'individus plus important afin d'obtenir éventuellement des résultats statistiquement significatifs.

Par ailleurs, nous souhaitons tester la réponse proliférative des cellules de Müller en conditions de suractivation de YAP dans des explants rétiniens en culture. Nous allons donc réaliser des cultures d'explants issus de souris sauvages, les traiter ou non avec XMU-MP-1, puis comparer le nombre de cellules de Müller en prolifération.

Dans l'ensemble, cette partie permettra de savoir si YAP est non seulement nécessaire mais également suffisant pour promouvoir la réentrée des cellules de Müller dans le cycle cellulaire.

### 3. Etude de l'interaction entre YAP et la voie de signalisation EGFR

D'un point de vue moléculaire, nous souhaitons valider notre modèle de boucle de rétrocontrôle positif entre YAP et la voie de signalisation EGFR en condition de dégénérescence. Pour cela, nous allons également utiliser le modèle d'explants rétiniens qui est très pratique pour les approches pharmacologiques puisqu'il permet de traiter facilement les rétines avec différentes molécules et de manière répétée. Nos données suggèrent que YAP régule l'activité de la voie EGFR dans les cellules de Müller réactives. Nous proposons l'existence d'une boucle de rétrocontrôle positif compte tenu des données de la littérature montrant dans divers modèles cellulaires une régulation de l'activité de YAP par la voie EGFR. Nous souhaitons démontrer l'existence d'une telle interaction dans la rétine. Nous allons donc mettre en culture des explants sauvages traités ou non avec de l'HB-EGF et analyser les niveaux protéiques de YAP et P-YAP ainsi que l'expression de gènes cibles de YAP. De plus, nous allons également traiter des explants rétiniens avec un inhibiteur des récepteurs de la famille des récepteurs à l'EGF et regarder les conséquences sur l'activité de YAP. Nous espérons ainsi renforcer notre modèle selon lequel, d'une part, YAP activerait l'expression des gènes codant les récepteurs et ligands de la voie EGFR, et d'autre part, la voie EGFR régulerait positivement l'activité de YAP. Une telle boucle de rétrocontrôle positif positionnerait YAP au cœur de la voie de signalisation EGFR dans les cellules de Müller.



---

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---





# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

## 1. YAP est spécifiquement exprimé dans les cellules de Müller de la rétine adulte

Peu d'études ont été réalisées sur YAP dans le système nerveux central adulte chez les mammifères et encore moins dans la rétine. Deux études ont cependant analysé l'expression et la fonction de YAP au cours du développement de la rétine chez la souris. Ces études ont montré que YAP est exprimé dans les progéniteurs rétinien au cours du développement embryonnaire et post-natal. Son expression diminue rapidement après la naissance pour atteindre un niveau basal dès P12 (Figure 43) (Zhang et al. 2012; Kim et al. 2016).

Nous avons ainsi été les premiers à montrer que YAP est spécifiquement exprimé dans les cellules de Müller de la rétine adulte. La protéine YAP étant principalement connue pour son implication dans la régulation de la prolifération, il nous a paru surprenant de la retrouver exprimée dans les cellules gliales de Müller qui sont quiescentes. De plus, la protéine YAP est exprimée aussi bien dans le cytoplasme des cellules de Müller que dans le noyau malgré l'absence d'activité proliférative de ces cellules. Sachant que YAP est particulièrement exprimé dans les cellules souches de différents tissus adultes comme l'intestin (Gregorieff et al. 2015), nous nous sommes demandé si YAP pouvait conférer à ces cellules de Müller un potentiel « souche » en cas de dégénérescence rétinienne.

Mes résultats ont d'ailleurs montré que le niveau de YAP est augmenté dans les cellules de Müller réactivées dans deux modèles (génétique et pharmacologique) de dégénérescence des photorécepteurs établissant pour la première fois un lien entre YAP et la gliose réactive des cellules de Müller. Nous avons par la suite orienté notre étude sur les mécanismes moléculaires en aval de YAP mais il est intéressant de se demander quels pourraient être les mécanismes régulant l'activation de YAP dans les cellules de Müller en condition de dégénérescence. Dans la littérature, de nombreux facteurs ont été identifiés comme pouvant activer YAP en conditions de stress (Zhu et al. 2015; Mao et al. 2015). Parmi ces facteurs, le stress oxydant pourrait intervenir dans notre modèle. La rétine est en effet exposée à un stress oxydant important au cours de la dégénérescence (Yu et al. 2000). La relation entre le stress oxydant et YAP n'est pas encore bien connue mais il a été montré que l'induction de ROS entraîne l'activation de YAP dans des cellules de gliomes (Dixit et al. 2014). Ainsi, le stress oxydant pourrait également activer YAP dans les cellules de Müller. Par ailleurs, il a également été montré que YAP est régulé par les stress mécaniques dans différents modèles *in vitro* (Dupont et al. 2011; Low et al. 2014; Wada et al. 2011). Etant donné le remodelage du tissu qui a lieu dans la rétine

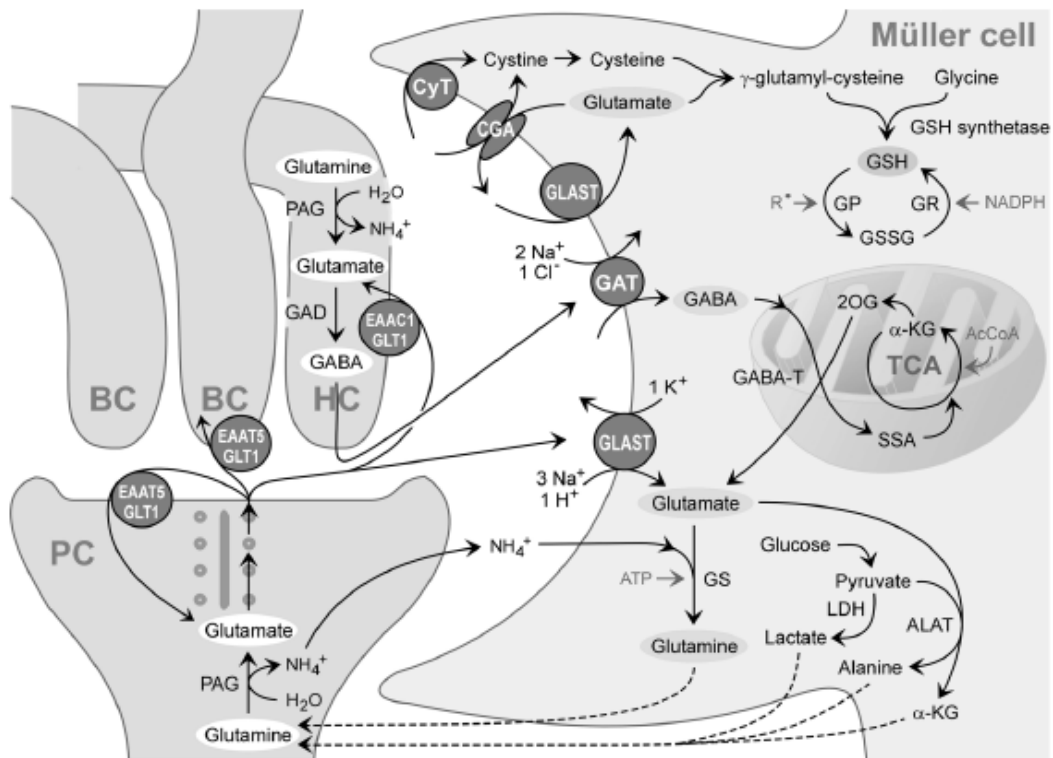


au cours de la dégénérescence (Gargini et al. 2007; Barhoum et al. 2008), nous pouvons imaginer que dans ce contexte aussi des stress mécaniques s'exercent sur les cellules et pourraient réguler le niveau protéique et l'activité de YAP dans les cellules de Müller. Enfin, la voie de signalisation EGFR connue pour être activée dans les cellules de Müller réactivées (Close et al. 2006) a été identifiée comme un régulateur de l'activité de YAP dans des cellules humaines et murines (Haskins et al. 2014; Sudol 2014; Yan et al. 2017). Ainsi, nous pouvons donc également émettre l'hypothèse d'une activation de YAP par la voie de signalisation EGFR dans notre modèle. Les interactions entre YAP et la voie EGFR seront par ailleurs développées dans le paragraphe 3 de cette discussion.

## 2. YAP semble nécessaire au bon fonctionnement des cellules de Müller

De manière très intéressante, nos résultats suggèrent que YAP est nécessaire au maintien de certaines fonctions des cellules de Müller en conditions physiologiques. Mes premières analyses phénotypiques des rétines de souris *Yap* CKO en condition physiologique m'ont laissé penser que la perte de *Yap* n'avait pas de conséquences ni sur les cellules de Müller elles-mêmes ni sur le reste de la rétine. Cependant, une étude plus poussée utilisant de nombreux marqueurs des cellules de Müller m'a permis de découvrir que l'expression de plusieurs protéines spécifiquement exprimées dans les cellules de Müller était diminuée dans les souris *Yap* CKO et ce, dès deux mois.

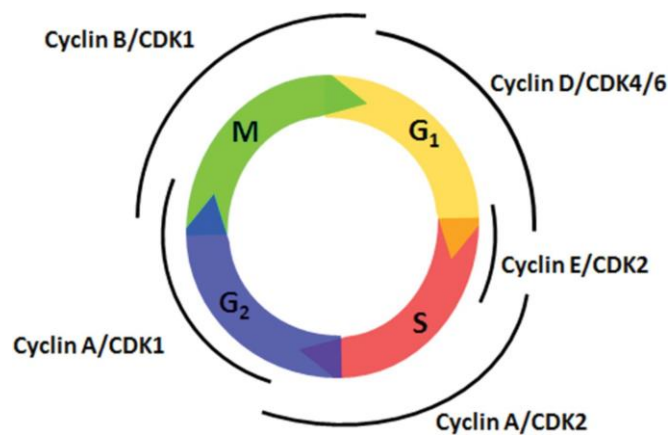
Nous avons ainsi montré que deux cyclines de type D, la Cycline D1 et la Cycline D3 ont un niveau protéique réduit dans les souris *Yap* CKO en comparaison aux contrôles. Les cyclines D1 et D3 sont spécifiquement exprimées dans les noyaux des cellules de Müller de la rétine adulte (Dyer & Cepko 2000; Kohno et al. 2006; Wan et al. 2008). Avec la Cycline D2 qui n'est, elle, pas détectée dans la rétine de souris adulte en condition physiologique, elles forment la famille des cyclines D qui a pour fonction d'activer les kinases cyclines-dépendantes CDK4 et CDK6 au cours de la phase G1 du cycle cellulaire afin de permettre le passage en phase S (Massagué 2004). Il est donc surprenant de retrouver ces protéines dans les cellules quiescentes que sont les cellules de Müller. Le rôle de ces protéines dans le fonctionnement des cellules de Müller en condition physiologique n'est à ce jour pas connu. Il a cependant été montré que dans les cellules de Müller quiescentes, la Cycline D3 interagit avec la protéine p27<sup>Kip1</sup> un inhibiteur des CDK. Le niveau protéique de p27<sup>Kip1</sup> diminue très vite en cas de lésion de la rétine permettant ainsi à la Cycline D3 d'induire la réentrée dans le cycle cellulaire des cellules de Müller (Dyer & Cepko 2000). La Cycline D3 pourrait donc être exprimée dans les cellules de Müller pour permettre une réactivation rapide de ces cellules en cas de lésion. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la protéine Cycline D3 est exprimée dans différents types de cellules quiescentes et



**Figure 54: Métabolisme du GABA et du glutamate dans la couche plexiforme externe de la rétine de mammifères.** La synapse « à ruban » d'un photorécepteur (PR) synthétise du glutamate qui est continuellement libéré. Les éléments post-synaptiques sont les dendrites des cellules bipolaires (BC) et des cellules horizontales (HC). Les cellules horizontales libèrent du GABA qui est généré à partir du glutamate. Le complexe synaptique est entouré par les cellules de Müller : le côté droit du schéma montre le système de recyclage des neurotransmetteurs et certaines voies métaboliques des cellules de Müller. Le glutamate, le GABA et l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) sont transportés dans les cellules de Müller et transformés en glutamine et  $\alpha$ -cétoglutarate ( $\alpha$ -KG). La glutamine est libérée des cellules de Müller et sert de précurseur pour la synthèse de neurotransmetteurs dans les neurones (cycle glutamate-glutamine). Le lactate, l'alanine, le pyruvate, l' $\alpha$ -cétoglutarate et la glutamine sont utilisés par les neurones comme substrats pour leur métabolisme énergétique. L'enzyme mitochondriale GABA transaminase (GABA-T) catalyse la formation de glutamate à partir de 2-oxoglutarate (2OG) couplée à la conversion du GABA en semialdéhyde succinique (SSA). Une autre voie métabolique est la production de glutathion réducté (GSH), qui est un antioxydant intracellulaire libéré par les cellules de Müller et capté par les neurones en cas de stress oxydant. AcCoA : acetyl coenzyme A ; ALAT : alanine aminotransferase ; CGA : cystine-glutamate antiporteur ; CyT : cystine transporter; EAAC1 : excitatory amino acid carrier 1; EAAT5 : excitatory amino acid transporter 5 ; GAD : glutamic acid decarboxylase ; GAT : GABA transporter ; GLAST : glutamate-aspartate transporter ; GLT-1 : glutamate transporter-1 ; GP : glutathione peroxidase ; GR : glutathione reductase ; GS : glutamine synthetase ; GSSG : glutathione disulfide ; LDH : lactate dehydrogenase ; PAG : phosphate-activated glutaminase ; R : radicaux libres ; TCA : tricarboxylic acid cycle. D'après (Bringmann et al 2013).

qu'elle exerce des fonctions non associées au cycle cellulaire (Bartkova et al. 1998; Jin et al. 2009; Athar & Parnaik 2015). La Cycline D3 interagit avec et régule l'activité transcriptionnelle de différents récepteurs comme des récepteurs aux stéroïdes, aux œstrogènes ou encore à la vitamine D (Despouy et al. 2003; McMahon et al. 1999; Jian et al. 2005). Elle interagit également avec des facteurs de transcription (Inoue & Sherr 1998; Liu et al. 2004) et il a par exemple été montré qu'elle régule la transcription de plus de 200 gènes dans les lymphocytes B (Sarruf et al. 2005; Powers et al. 2012). Il est donc possible que la Cycline D3 exerce également des fonctions de régulation de l'expression de gènes dans les cellules de Müller de la rétine. Comme son expression est diminuée dans les souris *Yap* CKO et qu'il a été montré par ailleurs que le gène de la Cycline D1 est une cible directe de YAP, il serait intéressant de chercher à savoir si *Ccnd3* est lui aussi un gène directement régulé par YAP.

Les autres protéines que nous avons trouvées diminuées dans les cellules de Müller en absence de *Yap*, Glutamine Synthétase (GS) et Aquaporine-4 (AQP4), sont des facteurs cruciaux pour le maintien de l'homéostasie rétinienne (Li et al. 2002; Shaked et al. 2002; Li et al. 2014). Les électrorétinogrammes que nous avons réalisés sur des souris de 2 mois n'ont pas révélé de défauts visuels. En revanche chez des souris âgées de 9 mois il semble que l'homéostasie rétinienne soit perdue et que l'acuité visuelle soit réduite en absence de *Yap*. Nous n'avons pas encore établi de lien fonctionnel entre la diminution de l'expression de GS et AQP4 et la perte de fonction visuelle chez les souris âgées mais nous souhaitons adresser cette question. Une étude plus approfondie des conséquences de la perte de *Yap* en conditions physiologiques au cours du temps va être menée par ma collègue Juliette Bitard. Nous souhaitons ainsi découvrir quelle est l'implication de YAP dans les fonctions des cellules de Müller et par quels mécanismes son absence conduit à la baisse de l'acuité visuelle au cours du vieillissement. Nous voulons plus particulièrement étudier l'impact de la perte de *Yap* sur le métabolisme du glutamate. En effet, les protéines GS et AQP4 sont toutes deux associées plus ou moins directement au métabolisme du glutamate. La GS qui est encodée par le gène *glul*, un gène cible de YAP (Cox et al. 2016), est l'enzyme qui effectue la transformation du glutamate en glutamine dans les cellules de Müller (Figure 54) (Bringmann et al. 2013; Shaked et al. 2002). On peut donc prédire qu'une réduction de son expression doit avoir un impact direct sur la fonction de recyclage du glutamate des cellules de Müller ce qui devrait affecter la transmission glutamatergique dans la rétine et éventuellement conduire à une neurotoxicité due à l'accumulation du glutamate dans le milieu extracellulaire (Barnett et al. 2000; Jablonski et al. 2001; Bringmann et al. 2013). La protéine AQP4 est avant tout impliquée dans le contrôle de l'homéostasie ionique et osmotique (Pannicke et al. 2010) mais elle semble également être nécessaire au maintien d'un métabolisme du glutamate normal dans la rétine (Li et al. 2014; Nishikawa et al. 2016). Ainsi, nous pensons que la perte de *Yap* qui entraîne une diminution de l'expression de GS et AQP4 pourrait conduire à une dérégulation du métabolisme du glutamate



**Figure 55: Régulation du cycle cellulaire par les complexes Cycline-CDK.** Le cycle cellulaire comprend la phase (S) de synthèse de l'ADN et la mitose (M), séparées par deux phases intermédiaires (G<sub>1</sub> et G<sub>2</sub>). Dans les cellules de mammifères différents complexes Cycline-CDK régulent la progression des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. D'après (Suryadinata et al 2010).

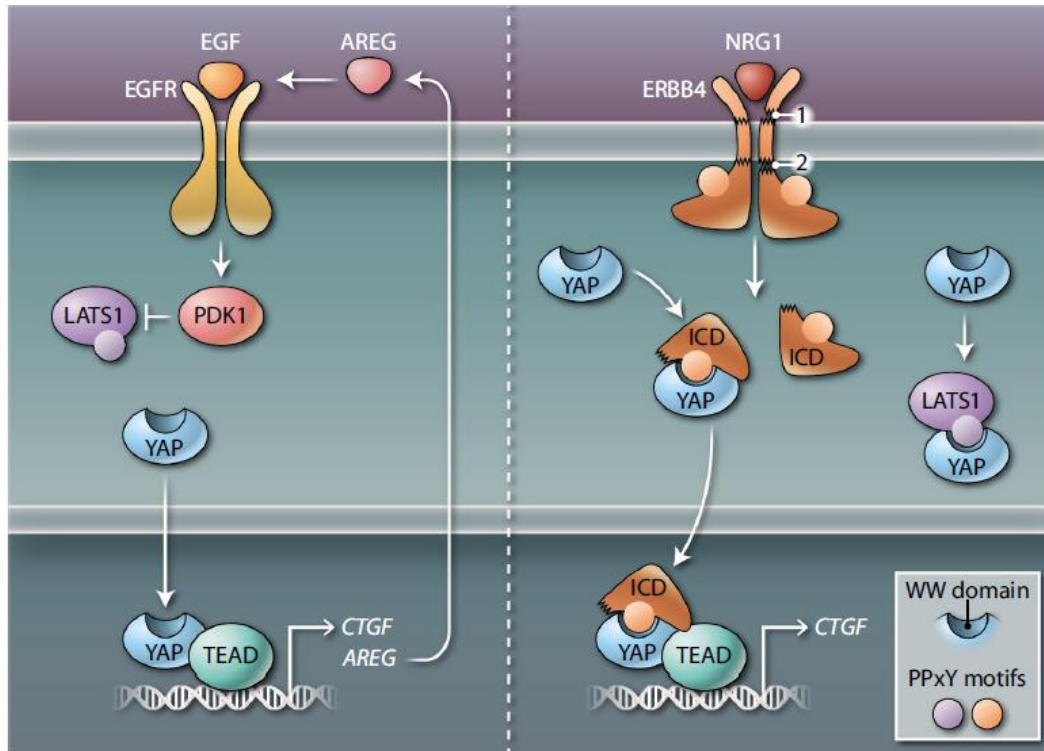
délétère pour la rétine. Il est probable que chez les souris *Yap* CKO de deux mois, le stress métabolique soit faible et/ou que la rétine par des mécanismes compensatoires parvienne à maintenir l'homéostasie rétinienne. En revanche, à 9 mois, nous pouvons supposer que le stress est probablement devenu chronique et que les mécanismes de compensation ne parviennent plus à protéger la rétine. La fragilité latente de la rétine *Yap* CKO serait ainsi révélée uniquement chez les souris âgées dont la rétine est sujette à plus de stress indépendamment de la perte de *Yap*. Ainsi, nous pensons qu'il serait intéressant d'étudier les conséquences de la délétion de *Yap* aussi dans un autre modèle de stress que celui du vieillissement. Nous pourrions envisager d'utiliser un modèle de stress modéré de la rétine tel que l'exposition à la lumière ou l'injection de doses sub-toxiques de MNU.

Le lien entre la protéine YAP et le métabolisme du glutamate peut paraître surprenant, cependant, de plus en plus d'études montrent des interactions entre YAP et le métabolisme cellulaire (Wrighton 2014; Santinon et al. 2016). De nombreuses études ont montré que YAP est régulé par différentes voies métaboliques (Santinon et al. 2016; Sorrentino et al. 2014) comme par exemple le métabolisme du glucose (W. Wang et al. 2015; Enzo et al. 2015). Dans notre modèle, il semble que ce soit à l'inverse YAP qui régule une voie métabolique (métabolisme du glutamate). Ce cas de figure a également été décrit dans la littérature (Wu et al. 2017; Zheng et al. 2017). Il a par exemple été montré que YAP régule le métabolisme du glucose notamment via la régulation de l'expression du gène du transporteur du glucose GLUT3 (Zheng et al. 2017). Une étude a également déjà établi un lien entre YAP et le métabolisme de la glutamine. Chez le poisson zèbre, il a été montré que YAP est impliqué dans le métabolisme de la glutamine dans le foie au cours de la croissance *via* sa régulation du gène de la GS. Dans ce modèle, la surexpression de YAP active la GS ce qui entraîne une augmentation du niveau de glutamine et stimule la synthèse de nucléotides dans le foie. YAP aurait ainsi comme rôle d'adapter la production de glutamine en fonction des besoins en nucléotides des hépatocytes (Cox et al. 2016). Ainsi, il semble que YAP pourrait faire partie de boucles de rétrocontrôle positif de différentes voies métaboliques.

### 3. YAP : un nouvel acteur de la réactivation des cellules de Müller

Notre étude fonctionnelle dans un contexte de dégénérescence rétinienne a permis de mettre en évidence que YAP est impliqué dans la réactivation des cellules de Müller. En particulier, l'absence de *Yap* affecte l'expression de plusieurs dizaines de gènes associés à la prolifération cellulaire. De manière intéressante, nos résultats ont révélé que la perte de *Yap* affecte l'expression transcriptionnelle des cyclines D1/2/3 et de CDK6 acteurs cruciaux de la régulation de la phase G1 du cycle cellulaire (Figure 55)(Massagué 2004; Suryadinata et al. 2010) suggérant que YAP est important pour la sortie de quiescence des cellules de Müller. La perte de *Yap* affecte également l'expression de gènes codant



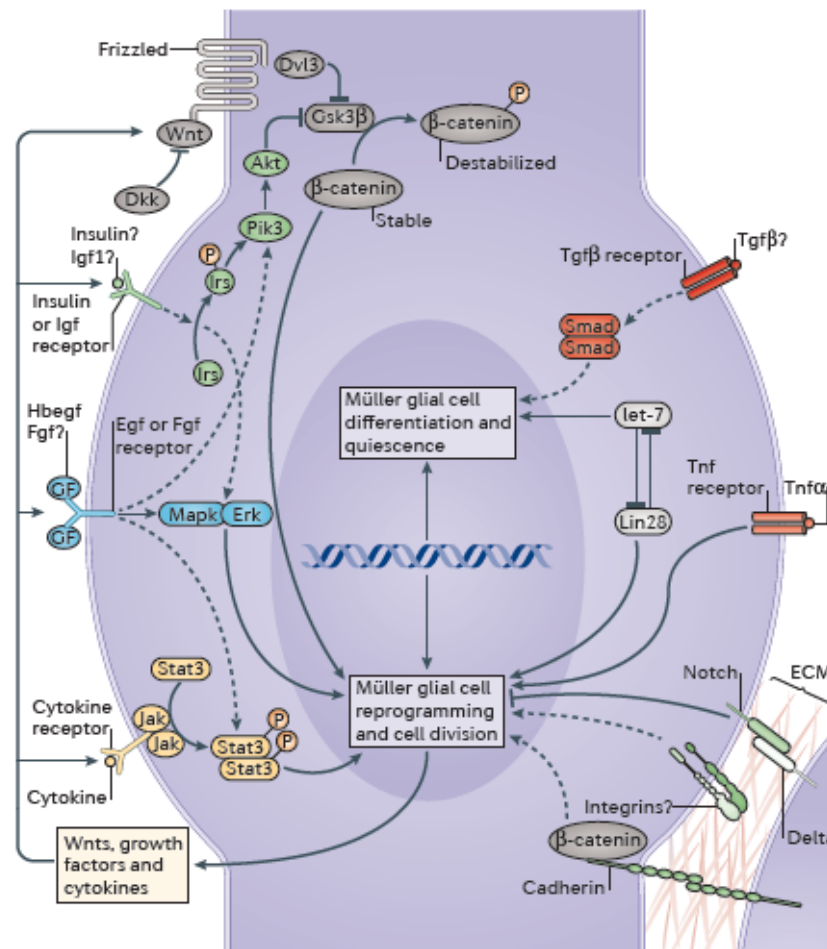


**Figure 56: Représentation schématique de la régulation de YAP par EGFR et ERBB4.** Dans la voie de signalisation EGFR (à gauche), l'activation de PDK1 inhibe l'activation de la kinase LATS1 de la voie Hippo, permettant à YAP de transloquer vers le noyau et d'interagir avec le facteur de transcription TEAD pour induire l'expression de gènes associés à la prolifération. Outre *Ctgf* (Connective tissue growth factor), YAP et TEAD induisent également l'expression du gène *Areg* codant l'amphiréguline qui stimule la voie EGFR formant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive. Avec l'aide des enzymes protéolytiques ADAM (1) et  $\gamma$ -secretase (2) (à droite), l'isoforme ERBB4 activé par NRG1 est clivé et génère un fragment ICD qui entre en compétition avec LATS1 pour fixer les domaines WW de YAP. YAP peut alors transloquer au noyau et réguler la transcription de gènes de la prolifération via la formation d'un complexe avec TEAD. Le fragment ICD d'ERBB4 se fixe à la fois sur YAP et TEAD apportant une stabilité complémentaire au complexe YAP-TEAD. D'après (Sudol et al 2014).

pour des récepteurs (EGFR et ERBB4) et des ligands (HB-EGF et NRG1) de la voie EGFR ainsi que l'activation de la voie MAPK/ERK et possiblement de la voie PI3K/AKT en aval de la voie EGFR. YAP semble donc impliqué dans la régulation de la voie EGFR dans les cellules de Müller en réactivation. La voie EGFR étant essentielle à la prolifération des cellules de Müller, ce résultat renforce l'idée d'un rôle important de YAP dans la réactivation des cellules de Müller. En effet, il a été montré que EGF or HB-EGF stimule la prolifération des cellules de Müller chez le poisson zèbre (Wan et al. 2012; Wan et al. 2014). Il n'a en revanche pas clairement été établi si l'HB-EGF est indispensable à la prolifération des cellules de Müller (Nelson et al. 2013). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de l'EGFR ou des MAPK (ras-mitogen activated protein kinase) chez le poisson zèbre suggère que la prolifération des cellules de Müller en réponse à une lésion est dépendante de la voie de signalisation EGFR/MAPK (Wan et al. 2012). Chez le poulet et le rongeur, il a été montré que l'HB-EGF stimule la prolifération des cellules de Müller via l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK (Todd et al. 2015; Close et al. 2006; Karl et al. 2008). La signalisation EGFR/MAPK/ERK est en fait au cœur d'interactions entre beaucoup d'autres voies de signalisation comme les voies Notch, Wnt ou TGF- $\beta$  (Paul et al. 2013). Dans la rétine, il a par exemple été montré que l'EGF stimule la prolifération des cellules de Müller via un mécanisme dépendant de la voie BMP (Ueki & Reh 2013). Nos données montrant l'impact de YAP sur l'activité de la voie EGFR implique donc pour la première fois un acteur clé de la voie de signalisation Hippo dans le réseau de signalisation impliqué dans la réactivation des cellules de Müller. Par ailleurs, il a été montré dans d'autres tissus que la voie EGFR régule l'activité de YAP (Figure 56) (Haskins et al. 2014; Yan et al. 2017), ce qui nous permet de proposer qu'une boucle de rétrocontrôle positif pourrait intervenir entre YAP et la voie EGFR dans les cellules de Müller en réponse à une lésion. Les expériences permettant de renforcer cette hypothèse vont être réalisées comme expliqué précédemment (pages 231).

Mon modèle *in vivo* ne permettant pas d'étudier le rôle de YAP dans le processus complet de prolifération des cellules de Müller, je vais réaliser des expériences *ex vivo* dans un contexte permettant aux cellules de Müller de réellement proliférer. Ces expériences que j'ai présentées page 229 devraient me permettre de déterminer si YAP est nécessaire à la prolifération des cellules de Müller et ainsi de finaliser mon article.

Par ailleurs, au vu des résultats montrant l'implication de YAP dans la régulation de nombreux gènes de la prolifération, il serait intéressant d'étudier le rôle de YAP dans la prolifération des cellules de Müller *in vivo* chez un organisme où ces cellules gliales se réactivent et prolifèrent efficacement pour régénérer la rétine. Le poisson zèbre serait un modèle de choix puisque chez cette espèce les cellules de Müller sont capables de régénérer parfaitement la rétine (Hamon et al. 2016; Wan & Goldman 2016). Le xénope constitue également un nouveau modèle d'étude de la prolifération des



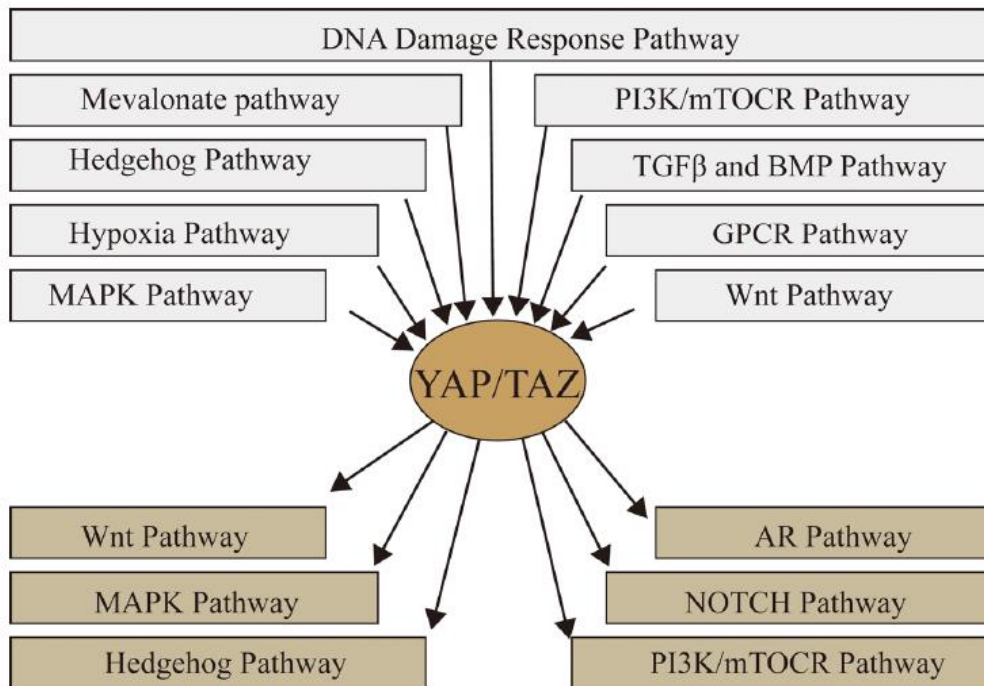
**Figure 57: Réseau de signalisation impliqué dans la reprogrammation des cellules de Müller et la prolifération des progéniteurs dérivés chez le poisson zèbre.** La régénération de la rétine fait intervenir de nombreuses cascades de signalisation. La diversité des voies de signalisation peut refléter la variété de types de lésion et des signaux qui stimule la régénération. Les voies de signalisation qui ont été montrées comme régulant la régénération de la rétine sont indiquées en lignes continues alors que celles qui sont indirectement ou hypothétiquement impliquées sont indiquées en lignes pointillées. Les facteurs sécrétés qui régulent la prolifération des cellules de Müller sont représentés en dehors de la cellule (ceux qui agissent sur la prolifération des cellules de Müller chez les oiseaux et les mammifères mais qui n'ont pas été testés chez le poisson zèbre sont annotés d'un point d'interrogation). D'après (Goldman et al 2014).

cellules de Müller. En effet, au laboratoire, nous travaillons avec le xénope et mes collègues ont récemment montré que chez cette espèce aussi les cellules de Müller sont capables de proliférer *in vivo* en réponse à une lésion sans ajout de facteurs exogènes (Langhe et al. 2017). L'équipe a montré que YAP s'exprime également spécifiquement dans les cellules de Müller chez le xénope et a entrepris l'étude de son rôle dans différents modèles de dégénérescence des photorécepteurs. Les données préliminaires de cette étude montrent que YAP semble nécessaire à la prolifération des cellules de Müller (Divya Ail, données non publiées).

#### 4. YAP au sein d'un réseau complexe de signalisation ?

La réponse des cellules de Müller à la dégénérescence des neurones rétiniens met en jeu un réseau de signalisation complexe. En effet, au cours de ce processus, de nombreux facteurs extrinsèques vont entraîner l'activation de différentes voies de signalisation dans les cellules de Müller qui vont réguler la reprogrammation et la prolifération de ces cellules. De nombreuses études ont été réalisées chez différentes espèces pour investiguer l'implication de voies telles que les voies Wnt/ $\beta$ -caténine, JAK/STAT, Notch, EGFR, TGF $\beta$  ou encore Sonic Hedgehog (Figure 57) (Goldman 2014; Hamon et al. 2016). L'ensemble de ces données est développé dans la partie II.2.4 de l'introduction (page 41). La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine est par exemple nécessaire à la prolifération des cellules de Müller aussi bien chez le poisson zèbre que chez le poulet et le rongeur (Ramachandran et al. 2011; Meyers et al. 2012; Gallina et al. 2016; Yao et al. 2016). Il a même été montré que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine suffit à déclencher la prolifération des cellules de Müller en absence de lésion chez la souris (Yao et al. 2016). Le rôle d'autres voies comme les voies Notch ou TGF $\beta$  n'est pas aussi clairement établi chez les différentes espèces (Hamon et al. 2016). Par exemple, des contradictions demeurent quant au rôle d'activation ou d'inhibition de la voie TGF $\beta$  sur la prolifération des cellules de Müller. (Lenkowski et al. 2013; Tappeiner et al. 2016; Todd et al. 2017; Close et al. 2005). Par ailleurs, un autre niveau de complexité vient du fait que l'ensemble de ces voies de signalisation interagissent ensemble. Des interactions entre la voie EGFR/MAPK et la voie Notch ont par exemple été montrées chez le poisson zèbre (Wan et al. 2012) ou encore entre la voie TGF $\beta$  et la voie Wnt chez le rongeur (Angbohang et al. 2016). Nos résultats suggèrent quant à eux des interactions entre YAP et la voie EGFR/MAPK.

Par ailleurs, dans la littérature, de nombreuses connexions entre YAP et d'autres voies de signalisations qui sont impliquées dans la réactivation des cellules de Müller ont été établies. Par exemple, des études ont montré que YAP interagit avec la voie MAPK, TGF $\beta$ , Wnt ou Notch dans différents types cellulaires particulièrement au cours du développement et du processus de tumorigenèse (Figure 58) (Mauviel et al. 2012; Varelas & Wrana 2012; Zhang et al. 2015). De manière très intéressante, YAP



**Figure 58: Résumé des interactions entre YAP/TAZ et les autres voies de signalisation chez les mammifères.** Les voies de signalisation MAPK, Wnt, TGFβ/BMP, GPCR, PI3K-mTOR, Hedgehog ainsi que les voies de l'hypoxie et de la réponse aux dommages à l'ADN régulent YAP/TAZ. Les effecteurs de la voie Hippo, YAP et TAZ, peuvent réguler les voies MAPK, Wnt, PI3K-mTOR, Hedgehog, Notch et la voie des récepteurs des androgènes (AR). D'après (Zhang et al 2015).

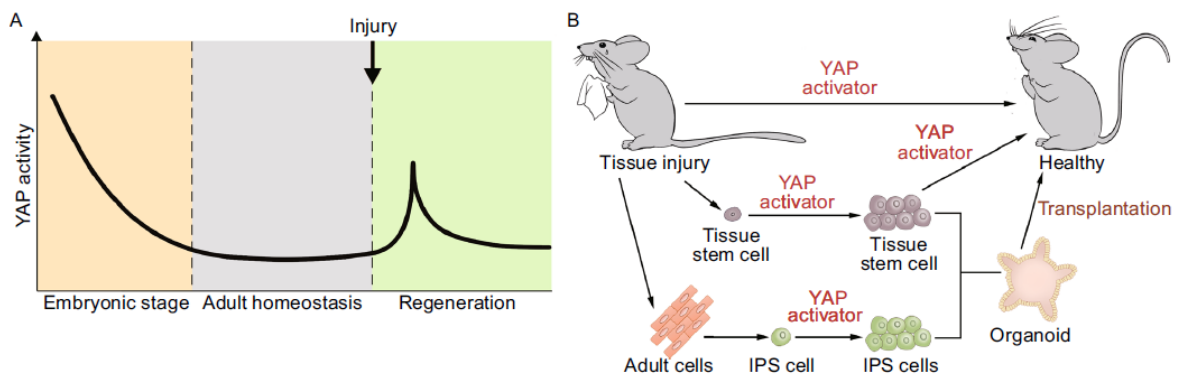
interagit avec des voies classiques également dans un contexte de régénération. Il a par exemple été montré que YAP promeut la régénération de l'intestin chez la souris en stimulant la reprogrammation des cellules souches intestinales d'une manière dépendante de la voie Wnt et de la voie EGFR (Gregorieff et al. 2015; Wang et al. 2017).

Ainsi, YAP semble être un acteur clé des réseaux de signalisation mis en jeu dans différents contextes cellulaires et est parfois même présenté comme un intégrateur des réseaux de signalisation (F.-X. Yu et al. 2015; Zhang et al. 2015). Il est donc probable que YAP interagisse avec d'autres voies que la voie EGFR dans le contexte de la réactivation des cellules de Müller. Nous pensons donc qu'il serait intéressant d'explorer l'interaction entre YAP et d'autres voies comme les voies Wnt, Notch, TGF $\beta$  dans les cellules de Müller dans un contexte de dégénérescence rétinienne. Ainsi, dans les cellules de Müller où de nombreuses voies de signalisation sont mises en jeu et où les connexions entre ces dernières sont difficiles à établir, YAP pourrait être un acteur central de la réactivation des cellules de Müller.

## 5. YAP pour stimuler le potentiel régénératif des cellules de Müller ?

Les maladies dégénératives de la rétine sont une des principales causes de cécité chez l'homme. Comme je l'ai développé dans mon introduction, il n'existe pas de traitement curatif des dystrophies rétiniennes à l'heure actuelle et la recherche étudie différentes stratégies thérapeutiques comme la thérapie génique et la thérapie cellulaire par transplantation de cellules issues de cellules souches. Une autre stratégie qui est de plus en plus étudiée est celle de réactiver les cellules de Müller afin de stimuler la régénération de la rétine à partir de nos propres cellules à potentiel souche. La recherche dans ce domaine est en pleine essor depuis la découverte du potentiel neurogénique des cellules de Müller chez le poisson zèbre en 2006. Plusieurs revues bibliographiques reprennent les avancées de la recherche sur le potentiel neurogénique des cellules de Müller dans la perspective de leur utilisation en médecine régénérative : « Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms » (Karl & Reh 2010) ; « Müller glia : a promising target for therapeutic regeneration » (Ahmad et al. 2011) ; « Regeneration of the retina: toward stem cell therapy for degenerative retinal diseases » (Jeon & Oh 2015). Dans ce contexte, la protéine YAP pourrait être un candidat intéressant comme cible thérapeutique pour « booster » la réactivation des cellules de Müller.

Le rôle de YAP dans la biologie des cellules souches adultes et la régénération tissulaire fait l'objet de nombreuses études. La protéine YAP est impliquée dans la régulation de la balance prolifération/différenciation de différents types de cellules souches adultes (voir introduction partie II.5.4.3). Par ailleurs de manière très intéressante, il semble également que YAP soit un acteur clé de la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (iPSCs).



**Figure 59: YAP dans la régénération tissulaire et la médecine régénérative.** (A) L'activité de YAP/TAZ est réduite à un niveau basal après la naissance et est immédiatement réactivée de manière transitoire en réponse aux lésions tissulaires. (B) Le potentiel de YAP/TAZ dans la médecine régénérative. Les activateurs de YAP/TAZ induisent directement un programme de régénération tissulaire in vivo. Par ailleurs, l'activation de YAP/TAZ peut promouvoir l'expansion des cellules souches tissu spécifiques ou d'iPSCs in vitro qui peuvent ensuite être transplantées au site de la lésion pour faciliter la régénération. D'après (Wang et al 2017).

La co-expression de *Yap* en plus des quatre facteurs de Yamanaka permet d'augmenter fortement l'efficacité de reprogrammation en iPSCs à partir de fibroblastes embryonnaires de souris (Lian et al. 2010). De manière encore plus impressionnante, chez la souris, une équipe a montré que l'expression transitoire de *Yap* exogène est suffisante pour induire la conversion de cellules primaires différenciées issues de différents tissus en cellules présentant les propriétés des cellules souches des tissus concernés (Panciera et al. 2016). Ces découvertes récentes sur les fonctions de la protéine YAP ouvrent la voie à son utilisation dans le cadre de la médecine régénérative (Figure 59) (Wang et al. 2017). Dans le cas des pathologies dégénérative de la rétine, il pourrait ainsi être envisageable d'utiliser YAP pour induire la reprogrammation des cellules gliales de Müller et stimuler leur potentiel régénératif. Dans ce contexte, une approche pharmacologique de suractivation de YAP est en cours au laboratoire. Elle repose sur l'utilisation du XMU-MP-1 comme décrit plus tôt (page 229). Par ailleurs, nous avons décidé de réaliser des expériences de surexpression de YAP dans les cellules de Müller dans un modèle murin de rétinite pigmentaire (souris *rd10*) grâce à l'utilisation d'un virus adéno-associé (AAV) spécifique des cellules de Müller (variant ShH10). Dans ce but, nous avons débuté une collaboration avec l'équipe de Deniz Dalkara de l'Institut de la Vision qui est spécialisée dans l'utilisation de cet outil dans la rétine. Pour espérer avoir un effet majeur, l'idée est de surexprimer une forme de YAP constitutivement active qui ne peut pas être phosphorylée par les kinases LATS1/2.

Il a été montré que l'expression transitoire de YAP est suffisante pour reprogrammer des cellules différenciées en cellules souches (Panciera et al. 2016). Ainsi, nous n'excluons pas que l'approche pharmacologique qui permet une suractivation transitoire de YAP soit en fait à privilégier par rapport à l'approche AAV qui conduit à une surexpression permanente de YAP. Il pourrait en effet être important de stopper la suractivation de YAP afin dans un deuxième temps de favoriser la neurogenèse à partir des progéniteurs dérivés des cellules de Müller. Une autre limitation à laquelle nous pourrions être confrontés est que la suractivation de YAP par le XMU-MP-1 pourrait ne pas être assez efficace. En effet, nous savons que YAP est régulé par de nombreux facteurs et voies de signalisations et que, en conséquence, l'inhibition des kinases de la voie Hippo pourrait ne pas être suffisante pour stimuler efficacement l'activité de YAP. De nombreuses études pharmacologiques sont en cours pour trouver des inhibiteurs et des activateurs de YAP. Ainsi, nous espérons que dans un futur proche de nouvelles molécules pourront être testées dans notre modèle.

Pour conclure, les données de la littérature sur la capacité de YAP à reprogrammer des cellules somatiques et à favoriser la régénération de certains organes, nous laissent espérer des résultats très prometteurs quant à son utilisation pour la réactivation des cellules de Müller chez les mammifères. Cependant, nous sommes conscients que cette stratégie pourrait être confrontée à des difficultés liées au contexte inflammatoire (voir chapitre suivant) ou encore au contexte épigénétique. En effet, nous





savons qu'un aspect très important de la reprogrammation des cellules de Müller est la régulation épigénétique (Pollak et al. 2013; Jorstad et al. 2017). Il a en effet été montré que la perte du potentiel neurogénique chez les cellules de Müller adultes est accompagnée d'une diminution d'accessibilité de la chromatine des gènes de pluripotence suggérant que des facteurs épigénétiques limitent le potentiel régénératif (Jorstad et al. 2017). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'inhibition des histones désacétylases potentialise l'effet de la surexpression de *Ascl1*, un facteur de reprogrammation, permettant aux cellules de Müller adultes de régénérer des neurones fonctionnels dans un modèle *in vivo* de dégénérescence induite au NMDA (Jorstad et al. 2017). Ainsi, si l'efficacité de la suractivation de YAP dans les cellules de Müller n'est pas suffisante pour les stimuler, nous pourrions potentialiser les effets par un traitement avec un inhibiteur des histones désacétylases.

## 6. YAP acteur de la réponse inflammatoire de la rétine en condition de dégénérescence ?

La réponse inflammatoire qui implique des macrophages dérivés du sang ou résidents des tissus, est cruciale pour atténuer les infections, éliminer les cellules endommagées et même dans certains cas favoriser la réparation des tissus tels que la peau (Mescher 2017). En revanche, dans le système nerveux des mammifères, l'inflammation est généralement considérée comme un frein à la régénération ou même comme un facteur aggravant la dégénérescence. Cependant, il a récemment été montré que dans le cerveau de poisson zèbre, la réponse inflammatoire est un déclencheur important de la réponse régénérative (Kyritsis et al. 2012). Il semble que ce soit également le cas dans la rétine de poisson puisqu'il a été montré que les cytokines de la famille du TNF- $\alpha$  ou de l'interleukine 6 (IL-6) favorisent la reprogrammation et la prolifération des cellules gliales de Müller en réponse à une lésion (Goldman 2014). De plus, il a été rapporté que les cellules microgliales résidentes de la rétine de poisson zèbre sont impliquées dans l'activation du processus de régénération même si dans un second temps elles peuvent devenir délétères (White et al. 2017). Tout ceci est en contraste avec la rétine de mammifère où l'inflammation promeut la gliose, la fibrose et la cicatrisation au dépend de la régénération. Une question très intéressante serait ainsi d'étudier si des différences dans la réponse inflammatoire pourraient expliquer en partie les différences d'efficacité de régénération entre les espèces.

Ainsi, l'identification des signaux moléculaires reliant l'inflammation et l'activité des cellules souches au cours de la régénération nous paraît essentielle dans le contexte de la médecine régénérative. La voie de signalisation Hippo/YAP pourrait être impliquée dans la relation entre inflammation et régénération. Des études récentes chez la souris suggèrent en effet que la régénération tissulaire

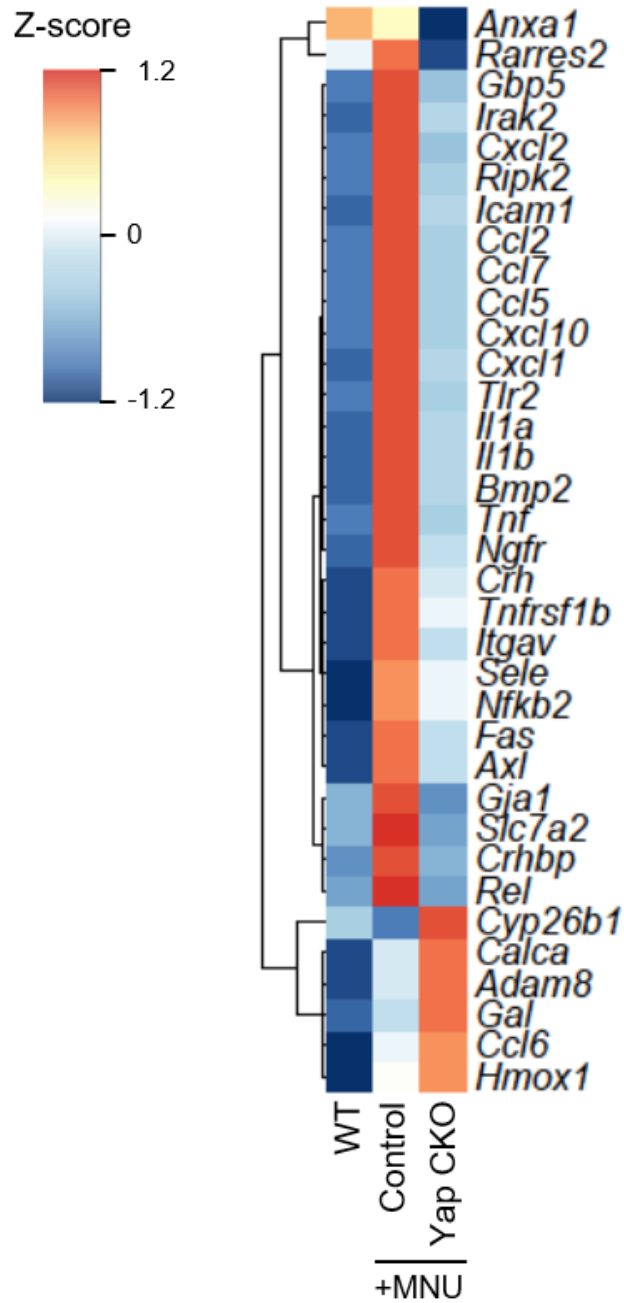


Figure 60: Hierarchical clustering analysis of the 35 DEGs from the GO BP “inflammatory response” (GO:0006954) and the resulting heatmap representing the z-score expression values for each condition.

induite par YAP nécessiterait des signaux inflammatoires (Taniguchi et al. 2015; Su et al. 2015). De plus, différentes données laissent penser que YAP pourrait lui-même être un régulateur de la neuroinflammation et réguler par exemple l'expression de IL-6 (Huang, Wang, et al. 2016; Emre & Imhof 2014; T. Kim et al. 2015). Nous pensons donc qu'il serait très intéressant de déterminer si YAP pourrait être impliqué dans des mécanismes moléculaires reliant l'inflammation à la réactivation des cellules de Müller en réponse à une lésion.

Notre étude transcriptomique en condition de dégénérescence rétinienne a révélé que de nombreux gènes de la réponse inflammatoire sont dérégulés dans les souris *Yap* CKO en comparaison aux contrôles suite à l'injection de MNU. L'analyse de « Gene Ontology » a en effet révélé que la réponse inflammatoire est un des processus biologiques les plus dérégulés en absence de *Yap* avec 35 gènes différentiellement exprimés (Figure 60). La majorité de ces gènes ont leur expression fortement augmentée en réponse à l'injection de MNU dans les souris contrôles. Dans les souris *Yap* CKO, cette augmentation d'expression en réponse au MNU est diminuée suggérant que YAP pourrait être impliqué dans la régulation de gènes associés à la réponse inflammatoire (Figure 60). De manière intéressante, nous avons observé que les voies de signalisation associées à l'inflammation qui sont dérégulées dans les souris *Yap* CKO sont plutôt des voies pro-inflammatoires telles que la voie TNF $\alpha$  et NF $\kappa$ B alors que les voies anti-inflammatoires ne semblent pas affectées. Cela suggère que YAP aurait plutôt un effet pro-inflammatoire dans la rétine de souris.

Par ailleurs, il est connu que l'expression de nombreuses cytokines est augmentée dans la rétine en réponse à une lésion. Ces cytokines pro-inflammatoires comme CCL7, CCL2, CXCL1, CXCL10 ou IL1 $\beta$  sont sécrétées par les cellules microgliales et par les cellules de Müller. Elles sont impliquées dans le recrutement et l'activation des cellules microgliales (Wang & Wong 2010; Rutar et al. 2015; Natoli et al. 2017). De manière intéressante, la plupart des gènes codant pour ces cytokines impliquées dans les relations entre cellules de Müller et microglie ont leur expression diminuée dans les souris *Yap* CKO. Ces résultats suggèrent que YAP pourrait être impliqué dans le recrutement de la microglie et/ou dans la régulation de leur activation.

Nous avons ainsi déjà quelques évidences de l'implication de YAP dans la réponse inflammatoire. L'étude du rôle de YAP dans la réponse inflammatoire de la rétine et la recherche d'un éventuel lien entre inflammation et réactivation des cellules de Müller fera l'objet de projets de recherche au laboratoire dans les mois et années qui viennent, en collaboration avec Florian Sennlaub, spécialiste de l'inflammation dans la rétine à l'Institut de la Vision.



---

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES

---



## A

- van Adel, B.A. et al., 2005. Ciliary neurotrophic factor protects retinal ganglion cells from axotomy-induced apoptosis via modulation of retinal glia in vivo. *Journal of Neurobiology*, 63(3), pp.215–234.
- Ahmad, I. et al., 2011. Müller glia: A promising target for therapeutic regeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(8), pp.5758–5764.
- Alarcon, C. et al., 2009. Nuclear CDKs Drive Smad Transcriptional Activation and Turnover in BMP and TGF- $\beta$  Pathways. *Cell*, 139, pp.757–769.
- Anbanandam, A. et al., 2006. Insights into transcription enhancer factor 1 (TEF-1) activity from the solution structure of the TEA domain. , 103(46), pp.17225–17230.
- Angbohang, A. et al., 2016. Downregulation of the Canonical WNT Signaling Pathway by TGF $\beta$ 1 Inhibits Photoreceptor Differentiation of Adult Human Müller Glia with Stem Cell Characteristics. *Stem cells and development*, 25(1), pp.1–12.
- Aragona, M. et al., 2013. A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP / TAZ Regulation by Actin-Processing Factors Mechanical Regulation of Cell Proliferation through. *Cell*, 154(5), pp.1047–1059.
- Asaoka, Y. et al., 2014. The Hippo pathway controls a switch between retinal progenitor cell proliferation and photoreceptor cell differentiation in zebrafish. *PLoS ONE*, 9(5).
- Ashraf, A. & Pervaiz, S., 2015. Hippo circuitry and the redox modulation of hippo components in cancer cell fate decisions. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 69, pp.20–28.
- Ashtari, M. et al., 2015. Plasticity of the human visual system after retinal gene therapy in patients with Leber's congenital amaurosis. *Science Translational Medicine*, 7(296), pp.1–15.
- Athnasiou, D. et al., 2013. The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Letters*, 587(13), pp.2008–2017.



Athar, F. & Parnaik, V.K., 2015. Potential gene regulatory role for cyclin D3 in muscle cells. *Journal of Biosciences*, 40(3), pp.497–512.

Aylon, Y. et al., 2014. Lats2 is critical for the pluripotency and proper differentiation of stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(10), pp.624–633.

Azzolin, L. et al., 2014. YAP/TAZ incorporation in the  $\beta$ -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*, 158(1), pp.157–170.

## B

Bai, H. et al., 2012. Yes-associated protein regulates the hepatic response after bile duct ligation. *Hepatology*, 56(3), pp.1097–1107.

Bailey, T.J. et al., 2010. The inhibitor of phagocytosis, O-phospho-l-serine, suppresses Muller glia proliferation and cone cell regeneration in the light-damaged zebrafish retina. *Experimental Eye Research*, 91(5), pp.601–612.

Barhoum, R. et al., 2008. Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse. *Neuroscience*, 155(3), pp.698–713.

Barker, N., 2014. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(1), pp.19–33.

Barker, N. et al., 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*, 449(7165), pp.1003–1007.

Barnett, N.L., Pow, D. V. & Robinson, S.R., 2000. Inhibition of Muller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glia*, 30(1), pp.64–73.

Barry, E.R. et al., 2013. Restriction of intestinal stem cell expansion and the regenerative response by YAP. *Nature*, 493(7430), pp.106–110.

Bartkova, J. et al., 1998. Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene*, 17(8), pp.1027–1037.

- Bashyam, M.D. et al., 2005. Array-Based Comparative Genomic Hybridization Identifies Localized DNA Amplifications and Homozygous Deletions in Pancreatic Cancer 1 \*. , 7(6), pp.556–562.
- Basu, S. et al., 2003. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Molecular Cell*, 11(1), pp.11–23.
- Beach, K.M., Wang, J. & Otteson, D.C., 2017. Regulation of Stem Cell Properties of Müller Glia by JAK/STAT and MAPK Signaling in the Mammalian Retina. *Stem Cells International*, 2017, pp.1–15.
- Behar-Cohen, F. et al., 2009. Anatomie de la rétine. *Ophthalmologie*, 6(1), pp.1–14.
- Bejarano-Escobar, R. et al., 2017. Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. *Journal of Anatomy*.
- Belecky-Adams, T.L. et al., 2013. Reactive Muller Glia as Potential Retinal Progenitors. *Neural Stem Cells - New Perspectives*, p.75.
- Beltran, W.A., Rohrer, H. & Aguirre, G.D., 2005. Immunolocalization of ciliary neurotrophic factor receptor  $\alpha$   $\alpha$  ) in mammalian photoreceptor cells ( CNTFR $\alpha$ . *Molecular Vision*, (December 2004).
- Benhamouche, S. et al., 2010. Nf2/Merlin controls progenitor homeostasis and tumorigenesis in the liver. *Genes and Development*, 24(16), pp.1718–1730.
- Bennett, J. et al., 2012. AAV2 Gene Therapy Readministration in Three Adults with Congenital Blindness. *Science Translational Medicine*, 4(120), pp.1–24.
- Bennett, J., 2017. Taking Stock of Retinal Gene Therapy: Looking Back and Moving Forward. *Molecular Therapy*, 25(5), pp.1076–1094.
- Berk, B. et al., 2015. Brain-derived neurotrophic factor inhibits osmotic swelling of rat retinal glial (Müller) and bipolar cells by activation of basic fibroblast growth factor signaling. *Neuroscience*, 295, pp.175–86.
- Bernardos, R.L. et al., 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), pp.7028–7040.

- Beyer, T.A. et al., 2013. Switch enhancers interpret TGF- $\beta$  and hippo signaling to control cell fate in human embryonic stem cells. *Cell Reports*, 5(6), pp.1611–1624.
- Blackshaw, S. et al., 2004. Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biology*, 2(9), pp.1411–1431.
- Braisted, J.E., Essman, T.F. & Raymond, P.A., 1994. Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina. *Development (Cambridge, England)*, 120(9), pp.2409–2419.
- Bringmann, A., Iandiev, I., et al., 2009. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research*, 28(6), pp.423–451.
- Bringmann, A. et al., 2013. GABA and glutamate uptake and metabolism in retinal glial (Müller) cells. *Frontiers in Endocrinology*, 4(APR), pp.1–14.
- Bringmann, A. et al., 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(4), pp.397–424.
- Bringmann, A., Pannicke, T., et al., 2009. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochemistry International*, 54(3–4), pp.143–160.
- Bringmann, A., Reichenbach, A. & Wiedemann, P., 2004. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Research*, 36(5), pp.241–249.
- Byun, M.R. et al., 2012. TAZ is required for the osteogenic and anti-adipogenic activities of kaempferol. *Bone*, 50(1), pp.364–372.

## C

- Cabochette, P. et al., 2015. Yap controls retinal stem cell DNA replication timing and genomic stability. *eLife*, 4(September 2015), pp.1–23.
- Cai, J. et al., 2010. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes and Development*, 24(21), pp.2383–2388.
- 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. *FEBS Journal*, 273(18), pp.4264–4276.

- Calvo, F. et al., 2013. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nature Cell Biology*, 15(6), pp.637–646.
- Camargo, F.D. et al., 2007. YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Current Biology*, 17(23), pp.2054–2060.
- 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), p.3320.
- Cebulla, C.M. et al., 2012. A chick model of retinal detachment: cone rich and novel. *PloS one*, 7(9), p.e44257.
- Centanin, L., Hoeckendorf, B. & Wittbrodt, J., 2011. Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell stem cell*, 9(6), pp.553–62.
- Cepko, C.L. et al., 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(2), pp.589–595.
- Chan, E.H.Y. et al., 2005. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*, 24(12), pp.2076–2086.
- Chan, S.W. et al., 2009. TEADs Mediate Nuclear Retention of TAZ to Promote Oncogenic Transformation \*. , 284(21), pp.14347–14358.
- Chang, B. et al., 2002. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*, 42(4), pp.517–525.
- Che, X., Fan, X.Q. & Wang, Z.L., 2014. Mechanism of blood-retinal barrier breakdown induced by HIV-1. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(4), pp.768–772.
- Chen, Q. et al., 2015. Homeostatic control of Hippo signaling activity revealed by an endogenous activating mutation in YAP. *Genes and Development*, 29(12), pp.1285–1297.
- Chen, Y. yuan et al., 2014. N -methyl- N -nitrosourea-induced retinal degeneration in mice. *Experimental Eye Research*, 121, pp.102–113.
- Choi, R.Y. et al., 2011. Cone degeneration following rod ablation in a reversible model of retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(1), pp.364–73.

- Chong, D.Y. et al., 2008. Interleukin-6 as a photoreceptor neuroprotectant in an experimental model of retinal detachment. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(7), pp.3193–3200.
- Chung, H. et al., 2016. Yap 1 is dispensable for self-renewal but required for proper differentiation of mouse embryonic stem. , 17(4), pp.1–11.
- Close, J.L. et al., 2006. Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal rat retina. *Glia*, 54(2), pp.94–104.
- Close, J.L., Gumuscu, B. & Reh, T. a, 2005. Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development (Cambridge, England)*, 132(13), pp.3015–3026.
- Cockburn, K., Biechele, S. & Garner, J., 2013. Report The Hippo Pathway Member Nf2 Is Required for Inner Cell Mass Specification. *Current Biology*, 23(13), pp.1195–1201.
- Conner, C. et al., 2014. Repressing Notch Signaling and Expressing TNF Are Sufficient to Mimic Retinal Regeneration by Inducing Muller Glial Proliferation to Generate Committed Progenitor Cells. *Journal of Neuroscience*, 34(43), pp.14403–14419.
- Coorey, N.J. et al., 2012. The role of glia in retinal vascular disease. *Clinical and Experimental Optometry*, 95(3), pp.266–281.
- Cox, A.G. et al., 2016. Yap reprograms glutamine metabolism to increase nucleotide biosynthesis and enable liver growth. *Nature Cell Biology*, 18(8), pp.886–896.
- Cuenca, N. et al., 2014. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in retinal and eye research*, 43(July), pp.1–59.
- Cui, C. Bin et al., 2003. Transcriptional coactivation of bone-specific transcription factor Cbfa1 by TAZ. *Molecular and cellular biology*, 23(3), pp.1004–1013.

## D

- Dai, M., Xia, X.B. & Xiong, S.Q., 2012. BDNF regulates GLAST and glutamine synthetase in mouse retinal Müller cells. *Journal of Cellular Physiology*, 227(2), pp.596–603.

- Dai, Z. et al., 2003. A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. , 12(7), pp.791–801.
- Dalkara, D. et al., 2016. Let There Be Light: Gene and Cell Therapy for Blindness. *Human Gene Therapy*, 27(2), pp.134–147.
- Das, A. V et al., 2006. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Developmental biology*, 299(1), pp.283–302.
- Del Debbio, C.B. et al., 2010. Notch and Wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by müller cells in adult mammalian retina. *PLoS ONE*, 5(8), p.e12425.
- Del Debbio, C.B. et al., 2016. Notch Signaling Activates Stem Cell Properties of Müller Glia through Transcriptional Regulation and Skp2-mediated Degradation of p27Kip1. *PloS one*, 11(3), p.e0152025.
- Delyfer, M.-N. et al., 2005. Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the rd1 retina through the glial glutamate transporter GLAST? *Molecular vision*, 11(September), pp.677–87.
- Deng, Y. et al., 2016. Yap1 Regulates Multiple Steps of Chondrocyte Differentiation during Skeletal Development and Bone Repair. *CellReports*, 14(9), pp.2224–2237.
- Despouy, G. et al., 2003. Cyclin D3 is a cofactor of retinoic acid receptors, modulating their activity in the presence of cellular retinoic acid-binding protein II. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), pp.6355–6362.
- Dixit, D. et al., 2014. Chaetocin-induced ROS-mediated apoptosis involves ATM – YAP1 axis and JNK-dependent inhibition of glucose metabolism. , 5(5), pp.e1212-13.
- Dong, J. et al., 2007. Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in Drosophila and Mammals. , pp.1120–1133.
- Dupont, S. et al., 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350), pp.179–183.
- Dyer, M. a & Cepko, C.L., 2000. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nature neuroscience*, 3(9), pp.873–880.

## E

- Eastlake, K. et al., 2016. Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia*, 64(4), pp.495–506.
- Eichler, W. et al., 2004. Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Müller) cells in hypoxia. *Neuroreport*, 15(10), pp.1633–7.
- Elbediwy, A. et al., 2016. Integrin signalling regulates YAP/TAZ to control skin homeostasis. *Development*, pp.1674–1687.
- Emre, Y. & Imhof, B.A., 2014. Matricellular protein CCN1/CYR61: A new player in inflammation and leukocyte trafficking. *Seminars in Immunopathology*, 36(2), pp.253–259.
- Enzo, E. et al., 2015. Aerobic glycolysis tunes YAP/TAZ transcriptional activity. *The EMBO journal*, 34(10), p.e201490379.
- Escartin, C. et al., 2007. Activation of astrocytes by CNTF induces metabolic plasticity and increases resistance to metabolic insults. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(27), pp.7094–7104.
- Escartin, C., 2006. Ciliary Neurotrophic Factor Activates Astrocytes, Redistributes Their Glutamate Transporters GLAST and GLT-1 to Raft Microdomains, and Improves Glutamate Handling In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 26(22), pp.5978–5989.
- Espanel, X. & Sudol, M., 2001. Yes-associated Protein and p53-binding Protein-2 Interact through Their WW and SH3 Domains. *Journal of Biological Chemistry*, 276(17), pp.14514–14523.
- Evans, J.R., 2001. Risk factors for age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(2), pp.227–253.

## F

- Fan, F. et al., 2016. Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. *Science Translational Medicine*, 8(352), p.352ra108-352ra108.

- 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), pp.6303–6313.
- Fausett, B. V, Gumerson, J.D. & Goldman, D., 2008. The proneural basic helix-loop-helix gene *ascl1a* is required for retina regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(5), pp.1109–1117.
- Fernandez-L, A. et al., 2012. Oncogenic YAP promotes radioresistance and genomic instability in medulloblastoma through IGF2-mediated Akt activation. *Oncogene*, 31, pp.1923–1937.
- Fernandez-L, A. et al., 2009. YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. , pp.2729–2741.
- Fernández-sánchez, L. et al., 2015. Astrocytes and Müller Cell Alterations During Retinal Degeneration in a Transgenic Rat Model of Retinitis Pigmentosa. , 9(December), pp.1–16.
- Fimbel, S.M. et al., 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), pp.1712–1724.
- Finger, R.P. et al., 2014. Predictors of anti-VEGF treatment response in neovascular age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 59(1), pp.1–18.
- Fischer, A.J. et al., 2010. A novel type of glial cell in the retina is stimulated by insulin-like growth factor 1 and may exacerbate damage to neurons and Müller glia. *Glia*, 58(6), pp.633–49.
- Fischer, A.J. et al., 2002. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), pp.9387–9398.
- Fischer, A.J. et al., 2009. Mitogen-activated protein kinase-signaling regulates the ability of Müller glia to proliferate and protect retinal neurons against excitotoxicity. *Glia*, 57(14), pp.1538–1552.



- Fischer, A.J., 2005. Neural regeneration in the chick retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24(2), pp.161–182.
- Fischer, A.J. et al., 2014. Reactive microglia and macrophage facilitate the formation of Müller glia-derived retinal progenitors. *Glia*, 62, pp.1608–1628.
- Fischer, A.J. & Bongini, R., 2010. Turning Müller glia into neural progenitors in the retina. *Molecular Neurobiology*, 42(3), pp.199–209.
- Fischer, A.J., Bosse, J.L. & El-Hodiri, H.M., 2013. The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Experimental eye research*, 116, pp.199–204.
- Fischer, A.J. & Reh, T.A., 2002. Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. *Developmental biology*, 251(2), pp.367–379.
- Fischer, A.J. & Reh, T.A., 2000. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Developmental biology*, 220(2), pp.197–210.
- Fischer, A.J., Scott, M.A. & Tuten, W., 2009. Mitogen-activated protein kinase-signaling stimulates Müller glia to proliferate in acutely damaged chicken retina. *Glia*, 57(2), pp.166–81.
- Fossdal, R. et al., 2004. A novel TEAD1 mutation is the causative allele in Sveinsson's chorioretinal atrophy (helicoid peripapillary chorioretinal degeneration). *Human Molecular Genetics*, 13(9), pp.975–981.
- Franze, K. et al., 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), pp.8287–8292.
- Frasson, M. et al., 1999. Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nature medicine*, 5(10), pp.1183–1187.
- Freitas, H.R. & Reis, R.A. de M., 2017. Glutathione induces GABA release through P2X7R activation on Müller glia. *Neurogenesis (Austin, Tex.)*, 4(1), p.e1283188.

## G

- Gaffney, C.J. et al., 2012. Identification, basic characterization and evolutionary analysis of differentially spliced mRNA isoforms of human YAP1 gene. *Gene*, 509(2), pp.215–222.
- Gallina, D. et al., 2016. Wnt/ $\beta$ -catenin-signaling and the formation of Müller glia-derived progenitors in the chick retina. *Developmental Neurobiology*, 76(9), pp.983–1002.
- Gallina, D., Todd, L. & Fischer, A.J., 2014. A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Experimental Eye Research*, 123, pp.121–130.
- Gallina, D., Zelinka, C. & Fischer, A.J., 2014. Glucocorticoid receptors in the retina, Müller glia and the formation of Müller glia-derived progenitors. *Development (Cambridge, England)*, pp.3340–3351.
- Gandhirajan, R.K. et al., 2016. Cysteine S -Glutathionylation Promotes Stability and Activation of the Hippo Downstream Effector Transcriptional Co-activator with PDZ-binding Motif ( TAZ ) \*. *The Journal Of Biological Chemistry*, 291(22), pp.11596–11607.
- García, M. & Vecino, E., 2003. Role of Müller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histology and Histopathology*, 18(4), pp.1205–1218.
- Garg, A. et al., 2017. Stem Cell Therapies in Retinal Disorders. *Cells*, 6(1), p.4.
- Gargini, C. et al., 2007. Retinal Organization in the Retinal Degeneration 10 (rd10) Mutant Mouse: A Morphological and ERG Study. *J Comp Neurol*, 502, pp.222–238.
- Gee, S.T. et al., 2011. Yes-associated protein 65 (YAP) expands neural progenitors and regulates pax3 expression in the neural plate border zone. *PLoS ONE*, 6(6).
- Ghai, K., Zelinka, C. & Fischer, A.J., 2010. Notch signaling influences neuroprotective and proliferative properties of mature Müller glia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(8), pp.3101–3112.
- Giannelli, S.G. et al., 2011. Adult human Muller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors. *Stem Cells*, 29(2), pp.344–356.
- Gibson, W.T. & Gibson, M.C., 2009. *Cell Topology , Geometry , and Morphogenesis in Proliferating Epithelia* 1st ed., Elsevier Inc.

- Giovannini, M. et al., 2000. Conditional biallelic Nf2 mutation in the mouse promotes manifestations of human neurofibromatosis type 2. , pp.1617–1630.
- von Gise, A. et al., 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), pp.2394–9.
- Goldman, D., 2014. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(7), pp.431–42.
- Gonzalez-Cordero, A. et al., 2013. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nature biotechnology*, 31(8), pp.741–7.
- Goodell, M. a, Nguyen, H. & Shroyer, N., 2015. Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5), pp.299–309.
- Gorsuch, R.A. et al., 2017. Sox2 regulates Müller glia reprogramming and proliferation in the regenerating zebrafish retina via Lin28 and Ascl1a. *Experimental Eye Research*.
- Gorsuch, R.A. & Hyde, D.R., 2014. Regulation of Müller glial dependent neuronal regeneration in the damaged adult zebrafish retina. *Experimental Eye Research*, 123, pp.131–140.
- Gregorieff, A. et al., 2015. Yap-dependent reprogramming of Lgr5+ stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature*, 526(7575), pp.715–8.
- Grigorian, E.N. & Poplinskaia, V.A., 1999. [Discovery of internal sources of the neural retinal regeneration after its detachment in Pleurodeles. II. The radioautography study]. *Izvestiia Akademii nauk. Serii biologicheskaja / Rossijskaja akademiia nauk*, (5), pp.583–91.
- Grijalva, J.L. et al., 2014. Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 307(2), pp.G196-204.
- Gu, D. et al., 2017. Directed transdifferentiation of Müller glial cells to photoreceptors using the sonic hedgehog signaling pathway agonist purmorphamine. *Molecular Medicine Reports*, pp.1–10.

Gumbiner, B.M. & Kim, N., 2014. The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. , pp.709–717.

Gutmann, D.H., Hirbe, A.C. & Haipek, C.A., 2001. Functional analysis of neurofibromatosis 2 ( NF2 ) missense mutations. , 10(14), pp.1519–1529.

## H

Halder, G., Dupont, S. & Piccolo, S., 2012. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nature Publishing Group*, 13(9), pp.591–600.

Hamilton, G. et al., 2009. Report ATM Regulates a RASSF1A-Dependent DNA Damage Response. *Current Biology*, 19(23), pp.2020–2025.

Hamon, A. et al., 2016. Müller glial cell-dependent regeneration of the neural retina: an overview across vertebrate model systems. *Developmental Dynamics*, pp.1–12.

Hao, Y. et al., 2008. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), pp.5496–5509.

Harada, C. et al., 2003. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience*, 122(1), pp.229–235.

Harada, C. et al., 2015. TrkB signaling in retinal glia stimulates neuroprotection after optic nerve injury. *American Journal of Pathology*, 185(12), pp.3238–3247.

Harun-Or-Rashid, M. et al., 2016. Endothelin B receptors on primary chicken müller cells and the human MIO-M1 müller cell line activate erk signaling via transactivation of epidermal growth factor receptors. *PLoS ONE*, 11(12), pp.1–24.

Harvey, K.F., Pflieger, C.M. & Hariharan, I.K., 2003. The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell*, 114(4), pp.457–467.

Haskins, J.W., Nguyen, D.X. & Stern, D.F., 2014. Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration. *Science Signaling*, 7(355), p.ra116-ra116.

- Hata, S. et al., 2012. A novel acetylation cycle of transcription co-activator yes-associated protein that is downstream of hippo pathway is triggered in response to S N2 alkylating agents. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), pp.22089–22098.
- Hau, J.C. et al., 2013. The TEAD4-YAP/TAZ Protein-Protein Interaction: Expected Similarities and Unexpected Differences. *ChemBioChem*, 14(10), pp.1218–1225.
- Hauck, S.M. et al., 2006. GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Molecular and cellular biology*, 26(7), pp.2746–57.
- Hayes, S. et al., 2007. Notch signaling regulates regeneration in the avian retina. *Dev Biol*, 312(1), pp.300–11.
- He, C. et al., 2015. YAP forms autocrine loops with the ERBB pathway to regulate ovarian cancer initiation and progression. *Oncogene*, 34(50), pp.6040–6054.
- Heallen, T. et al., 2011. Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size. *Science*, 332(April), pp.458–461.
- Heallen, T. et al., 2013. Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Development*, 140(23), pp.4683–90.
- Heiduschka, P. et al., 2013. Lens Injury Has a Protective Effect on Photoreceptors in the RCS Rat. *ISRN ophthalmology*, 2013, p.814814.
- Hidalgo, M. et al., 2014. Stem Cells and Regeneration in the Xenopus Retina. In A. Pébay, ed. *Regenerative Biology of the Eye, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine. Regenerative Biology of the Eye. New York, NY: Springer New York, pp. 83–99.
- Hiemer, S.E. & Varelas, X., 2013. Stem cell regulation by the Hippo pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(2), pp.2323–2334.
- Hippert, C. et al., 2015. Müller Glia Activation in Response to Inherited Retinal Degeneration Is Highly Varied and Disease-Specific. *Plos One*, 10(3), p.e0120415.
- Hirate, Y. et al., 2013. Polarity-Dependent Distribution of Angiomotin Localizes Hippo Signaling in Preimplantation Embryos. *Current Biology*, 23(13), pp.1181–1194.

- Hitchcock, P. et al., 2004. Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Progress in retinal and eye research*, 23(2), pp.183–94.
- Hitchcock, P.F. et al., 1992. Local regeneration in the retina of the goldfish. *Journal of Neurobiology*, 23(2), pp.187–203.
- Hollborn, M. et al., 2004. Characterization of the basic fibroblast growth factor-evoked proliferation of the human Müller cell line, MIO-M1. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 242(5), pp.414–422.
- Holt, E., Bertsch, W. & Harris, A., 1988. Cellular Determination in the Xenopus Retina Is Independent of Lineage and Birth Date division. , 1, pp.15–26.
- Hong, J.H. et al., 2005. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, 309(August), pp.1074–1079.
- Hong, L. et al., 2015. The Hippo signaling pathway in liver regeneration and tumorigenesis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 47(1), pp.46–52.
- Honjo, M. et al., 2000. Expression of Ciliary Neurotrophic Factor Activated by Acid – Induced Neuronal Death. , 41(2), pp.552–560.
- Hossain, Z. et al., 2007. Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of *Wwtr1*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(5), pp.1631–1636.
- De Hoz, R. et al., 2016. Retinal Macroglial Responses in Health and Disease. *BioMed Research International*, 2016.
- Huang, J. et al., 2005. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila homolog of YAP. *Cell*, 122(3), pp.421–434.
- Huang, W. et al., 2012. The N-terminal phosphodegron targets TAZ/WWTR1 protein for SCF  $\beta$ -TrCP-dependent degradation in response to phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), pp.26245–26253.
- Huang, Z., Wang, Y., et al., 2016. YAP Is a Critical Inducer of SOCS3, Preventing Reactive Astroglia. *Cerebral Cortex*, 26(5), pp.2299–2310.

Huang, Z., Hu, J., et al., 2016. YAP stabilizes SMAD1 and promotes BMP2-induced neocortical astrocytic differentiation. *Development*, 143(13), pp.2398–2409.

## I

Igarashi, Y. et al., 2000. Expression of receptors for glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin in the inner blood-retinal barrier of rats. *Cell structure and function*, 25, pp.237–241.

Imajo, M., Ebisuya, M. & Nishida, E., 2015. Dual role of YAP and TAZ in renewal of the intestinal epithelium. *Nat Cell Biol*, 17(1), pp.7–19.

Inomata, Y. et al., 2003. Neuroprotective effects of interleukin-6 on NMDA-induced rat retinal damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 302(2), pp.226–232.

Inoue, K. & Sherr, C.J., 1998. Gene expression and cell cycle arrest mediated by transcription factor DMP1 is antagonized by D-type cyclins through a cyclin-dependent-kinase-independent mechanism. *Molecular and cellular biology*, 18(3), pp.1590–600.

## J

Jablonski, M.M. et al., 2001. Pigment epithelium-derived factor supports normal Müller cell development and glutamine synthetase expression after removal of the retinal pigment epithelium. *Glia*, 35(1), pp.14–25.

Jadhav, A.P., Roesch, K. & Cepko, C.L., 2009. Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 28(4), pp.249–262.

Jayakody, S.A. et al., 2015. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement. *Progress in Retinal and Eye Research*, 46, pp.31–66.

Jayaram, H. et al., 2014. Transplantation of photoreceptors derived from human Müller glia restore rod function in the P23H rat. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(3), pp.745–757.

Jeon, C., Strettoi, E. & Masland, R.H., 1998. The Major Cell Populations of the Mouse Retina. , 18(21), pp.8936–8946.

- Jeon, S. & Oh, I.H., 2015. Regeneration of the retina: Toward stem cell therapy for degenerative retinal diseases. *BMB Reports*, 48(4), pp.193–199.
- Jia, J. et al., 2003. The Drosophila Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis service The Drosophila Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoti. *Genes & Development*, (214), pp.2514–2519.
- Jian, Q. et al., 2015. Acute retinal injury and the relationship between nerve growth factor, Notch1 transcription and short-lived dedifferentiation transient changes of mammalian Müller cells. *Vision Research*, 110(Part A), pp.107–117.
- Jian, Y. et al., 2005. Cyclin D3 interacts with vitamin D receptor and regulates its transcription activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 335(3), pp.739–748.
- Jiang, Q. et al., 2009. Yap Is Required for the Development of Brain, Eyes, and Neural Crest in Zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 384(1), pp.114–119.
- Jiang, Z. et al., 2006. Promoter hypermethylation-mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma. , 56, pp.450–458.
- Jiao, S. et al., 2014. Article A Peptide Mimicking VGLL4 Function Acts as a YAP Antagonist Therapy against Gastric Cancer. *Cancer Cell*, 25(2), pp.166–180.
- Jin, J. et al., 2009. The Age-Associated Decline of Glycogen Synthase Kinase 3b Plays a Critical Role in the Inhibition of Liver Regeneration □. *Society*, 29(14), pp.3867–3880.
- Johns, P.R., 1982. Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2(2), pp.178–98.
- Johns, P.R., 1977. Growth of the adult goldfish eye-I: Optics. *Journal of Comparative Neurology*, 176, pp.343–358.
- Johns, P.R. & Fernald, R.D., 1981. Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature*, 293(5828), pp.141–142.
- 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), pp.63–79.



- Joly, S. et al., 2007. Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: Evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(5), pp.2311–2320.
- Joly, S. et al., 2011. PAX6-positive Müller glia cells express cell cycle markers but do not proliferate after photoreceptor injury in the mouse retina. *Glia*, 59(7), pp.1033–1046.
- Jorstad, L. et al., 2017. Stimulation of functional neuronal regeneration from Müller glia in adult mice. *Nature*.
- Julian, D., Ennis, K. & Korenbrot, J.I., 1998. Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *The Journal of comparative neurology*, 394(3), pp.271–82.
- Justice, R.W. et al., 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), pp.534–546.

## K

- Kaan, H.Y.K. et al., 2017. Crystal structure of TAZ-TEAD complex reveals a distinct interaction mode from that of YAP-TEAD complex. *Scientific reports*, 7(1), p.2035.
- Kanai, F. et al., 2000. TAZ: A novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO Journal*, 19(24), pp.6778–6791.
- Karl, M.O. et al., 2008. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(49), pp.19508–19513.
- Karl, M.O. & Reh, T.A., 2010. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends in molecular medicine*, 16(4), pp.193–202.
- Kassen, S.C. et al., 2009. CNTF induces photoreceptor neuroprotection and Müller glial cell proliferation through two different signaling pathways in the adult zebrafish retina. *Experimental Eye Research*, 88(6), pp.1051–1064.

- Kassen, S.C., 2007. Time course analysis of gene expression during light-induced photoreceptor cell death and regeneration in albino zebrafish. *Developmental Neurobiology*, 67(8), pp.1009–1031.
- Kaylor, J.J. et al., 2013. Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Müller glial cells of the retina. *Nature chemical biology*, 9(1), pp.30–6.
- Kaylor, J.J. et al., 2014. Identification of the 11-cis-specific retinyl-ester synthase in retinal Müller cells as multifunctional O-acyltransferase (MFAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(20), pp.7302–7.
- Kim, J.Y. et al., 2016. Yap is essential for retinal progenitor cell cycle progression and RPE cell fate acquisition in the developing mouse eye. *Developmental Biology*, 419(2), pp.336–347.
- Kim, M., Kim, T. & Randy, L., 2015. Transcriptional Co-repressor Function of the Hippo Pathway Transducers YAP and TAZ. *Cell Reports*, 11(2), pp.270–282.
- Kim, M.H. & Joon, K., 2017. Role of YAP / TAZ transcriptional regulators in resistance to anti-cancer therapies. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(8), pp.1457–1474.
- Kim, T. et al., 2015. A basal-like breast cancer-specific role for SRF–IL6 in YAP-induced cancer stemness. *Nature Communications*, 6, p.10186.
- Kitagawa, M., 2007. A Sveinsson’s chorioretinal atrophy-associated missense mutation in mouse Tead1 affects its interaction with the co-factors YAP and TAZ. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361(4), pp.1022–1026.
- Kodaka, M. & Hata, Y., 2015. The mammalian Hippo pathway: Regulation and function of YAP1 and TAZ. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(2), pp.285–306.
- Koeberle, P. & Bähr, M., 2008. The upregulation of GLAST-1 is an indirect antiapoptotic mechanism of GDNF and neurturin in the adult CNS. *Cell Death and Differentiation*, pp.471–483.
- Kofuji, P. et al., 2000. Genetic Inactivation of an Inwardly Rectifying Potassium Channel (Kir4.1 Subunit) in Mice: Phenotypic Impact in Retina. *J. Neurosci.*, 20(15), pp.5733–5740.

- Kofuji, P. & Newman, E.A., 2004. Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience*, 129(4), pp.1045–1056.
- Kohli, P. et al., 2014. Proteomic and Metabolomic Approaches to Cell Physiology Label-free quantitative proteomic analysis of the YAP / TAZ interactome. , 14.
- Kohno, H., Sakai, T. & Kitahara, K., 2006. Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Müller cells after laser injury in adult rat retina. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244(1), pp.90–95.
- Komuro, A. et al., 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. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), pp.33334–33341.
- Kucharska, J. et al., 2014. Cyr61 activates retinal cells and prolongs photoreceptor survival in rd1 mouse model of retinitis pigmentosa. *Journal of Neurochemistry*, 130(2), pp.227–240.
- Kugler, M. et al., 2015. Heterozygous modulation of TGF- $\beta$  signaling does not influence Müller glia cell reactivity or proliferation following NMDA-induced damage. *Histochemistry and cell biology*, [Epub ahead of print].
- Kumar, A. et al., 2013. Müller glia in retinal innate immunity: a perspective on their roles in endophthalmitis. *Critical reviews in immunology*, 33(2), pp.119–35.
- Kyritsis, N. et al., 2012. Acute Inflammation Initiates the Regenerative Response in the Adult Zebrafish Brain. *Science*, 338(6112), pp.1353–1356.

## L

- Labin, A.M. & Ribak, E.N., 2010. Retinal glial cells enhance human vision acuity. *Physical Review Letters*, 104(15), pp.1–4.
- Laflamme, M.A. & Murry, C.E., 2011. Heart regeneration. *Nature*, 473(7347), pp.326–35.
- Lahne, M., Marton, R. & Hyde, D., 2013. The Role Of Rocks During Interkinetic Nuclear Migration In The Regenerating Adult Zebrafish Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(15), p.1164.

- Lai, Z.-C. et al., 2005. Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, *Cell*, 120(5), pp.675–685.
- Langhe, R. et al., 2017. Müller glial cell reactivation in *Xenopus* models of retinal degeneration. *Glia*, (September 2016), pp.1–17.
- Lapi, E. et al., 2008. PML, YAP, and p73 Are Components of a Proapoptotic Autoregulatory Feedback Loop. *Molecular Cell*, 32(6), pp.803–814.
- Lavado, A. et al., 2014. The tumor suppressor Nf2 regulates corpus callosum development by inhibiting the transcriptional coactivator Yap. *Development*, 141(21), pp.4182–4193.
- Lavado, A. et al., 2013. Tumor suppressor Nf2 limits expansion of the neural progenitor pool by inhibiting Yap/Taz transcriptional coactivators. *Development (Cambridge, England)*, 140(16), pp.3323–34.
- Lavail, M.M. et al., 1992. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light (light damage/retinal degeneration/photoreceptor rescue/neurotrophic factor/basic fibroblast growth factor). *Neurobiology*, 89(December), pp.11249–11253.
- Lawrence, J.M. et al., 2007. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem cells*, 25(8), pp.2033–2043.
- Le, Y.-Z., 2017. VEGF production and signaling in Müller glia are critical to modulating vascular function and neuronal integrity in diabetic retinopathy and hypoxic retinal vascular diseases. *Vision Research*.
- Lee, D.-H. et al., 2016. LATS-YAP/TAZ controls lineage specification by regulating TGF $\beta$  signaling and Hnf4 $\alpha$  expression during liver development. *Nature communications*, 7(May), p.11961.
- Lee, J.-H. et al., 2008. A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse. *The EMBO journal*, 27(8), pp.1231–42.
- Lee, K.-P. et al., 2010. The Hippo-Salvador pathway restrains hepatic oval cell proliferation, liver size, and liver tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), pp.8248–8253.

- Lee, M. et al., 2014. YAP and TAZ Regulate Skin Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(2), pp.518–525.
- Lei, Q.-Y. et al., 2008. TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 28(7), pp.2426–2436.
- Lenkowski, J.R. et al., 2013. Retinal regeneration in adult zebrafish requires regulation of TGF $\beta$  signaling. *Glia*, 61(10), pp.1687–97.
- Lenkowski, J.R. & Raymond, P. a., 2014. Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Progress in Retinal and Eye Research*, 40(January), pp.94–123.
- Levy, D. et al., 2008. Yap1 Phosphorylation by c-Abl Is a Critical Step in Selective Activation of Proapoptotic Genes in Response to DNA Damage. *Molecular Cell*, 29(3), pp.350–361.
- Li, C. et al., 2013. Arsenic-induced cutaneous hyperplastic lesions are associated with the dysregulation of Yap, a Hippo signaling-related protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438(4), pp.607–612.
- Li, J., Patil, R. V. & Verkman, A.S., 2002. Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Müller cell aquaporin-4 water channels. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(2), pp.573–579.
- Li, L., Eter, N. & Heiduschka, P., 2015. The microglia in healthy and diseased retina. *Experimental Eye Research*, 136, pp.116–130.
- Li, P. et al., 2013. Functional role of MsT1/MsT2 in embryonic stem cell differentiation. *PLoS ONE*, 8(11), pp.1–17.
- Li, X.M. et al., 2014. Abnormal glutamate metabolism in the retina of aquaporin 4 (AQP4) knockout mice upon light damage. *Neurological Sciences*, 35(6), pp.847–853.
- Lian, I. et al., 2010. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & development*, 24(11), pp.1106–18.
- Lin, L. et al., 2015. The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nature Publishing Group*, 47(3), pp.250–256.

- Lin, Z. et al., 2016. Acetylation of VGLL4 Regulates Hippo-YAP Signaling and Postnatal Cardiac Growth. *Developmental Cell*, 39(4), pp.466–479.
- Lin, Z. et al., 2014. Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circulation Research*, 115(3), pp.354–363.
- Liu, B. et al., 2014. The capacity of neural crest-derived stem cells for ocular repair. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 102(3), pp.299–308.
- Liu, B. et al., 2013. Wnt signaling promotes Müller cell proliferation and survival after injury. *Investigative ophthalmology & visual science*, 54(1), pp.444–53.
- Liu, H. et al., 2012. The Hippo pathway regulates stem cell proliferation, self-renewal, and differentiation. *Protein & Cell*, 3(4), pp.291–304.
- Liu, M. et al., 2015. YAP Regulates the Expression of Hoxa1 and Hoxc13 in Mouse and Human Oral and Skin Epithelial Tissues. , 35(8), pp.1449–1461.
- Liu, W. et al., 2004. Cyclin D3 interacts with human activating transcription factor 5 and potentiates its transcription activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321(4), pp.954–960.
- Liu, X. et al., 2015. IL-1b Induces IL-6 production in retinal Müller cells predominantly through the activation of P38 MAPK/NF-kB signaling pathway. *Experimental Cell Research*, 331(1), pp.223–231.
- Liu, Y. et al., 2010. Taz-tead1 links cell-cell contact to zeb1 expression, proliferation, and dedifferentiation in retinal pigment epithelial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(7), pp.3372–3378.
- Livesey, F.J., Young, T.L. & Cepko, C.L., 2004. An analysis of the gene expression program of mammalian neural progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), pp.1374–9.
- Löffler, K. et al., 2015. Age-dependent Müller glia neurogenic competence in the mouse retina. *Glia*, 63(10), pp.1809–1824.
- Lombardo, F., 1968. La rigenerazione della retina negli adulti di un Teleosteo (Regeneration of the retina in an adult teleost). *Accad. Lincei-Rend. Sci. Fis. Mat. Nat. Ser.*, 8, pp.631–635.

- Long, K.O. et al., 1986. Disc shedding and autophagy in the cone-dominant ground squirrel retina. *Experimental Eye Research*, 43(2), pp.193–205.
- Low, B.C. et al., 2014. YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth. *FEBS Letters*, 588(16), pp.2663–2670.
- Lu, L. et al., 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), pp.1437–42.
- Lu, Y.B. et al., 2013. Biomechanical properties of retinal glial cells: Comparative and developmental data. *Experimental Eye Research*, 113, pp.60–65.
- Lundkvist, A. et al., 2004. Under stress, the absence of intermediate filaments from Muller cells in the retina has structural and functional consequences. *J Cell Sci*, 117(Pt 16), pp.3481–3488.
- Lust, K. et al., 2016. De novo neurogenesis by targeted expression of Atoh7 to Müller glia cells. *Development*, (April), pp.1874–1883.

## M

- Mahoney, W.M. et al., 2005. The transcriptional co-activator TAZ interacts differentially with transcriptional enhancer factor-1 (TEF-1) family members. *The Biochemical journal*, 388(Pt 1), pp.217–225.
- Maier, W. & Wolburg, H., 1979. Regeneration of the goldfish retina after exposure to different doses of ouabain. *Cell and tissue research*, 202(1), pp.99–118.
- Makita, R. et al., 2008. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *American journal of physiology. Renal physiology*, 294(3), pp.F542–F553.
- Mansour-Robaey, S. et al., 1994. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5), pp.1632–6.

- Mao, B. et al., 2015. Hippo signaling in stress response and homeostasis maintenance. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 47(1), pp.2–9.
- Mao, B. et al., 2014. SIRT1 regulates YAP2-mediated cell proliferation and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 33(11), pp.1468–74.
- Masland, R.H., 2001. Neuronal diversity in the retina. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(4), pp.431–436.
- Masland, R.H., 2012. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron*, 76(2), pp.266–280.
- Massagué, J., 2004. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432(7015), pp.298–306.
- Matallanas, D. et al., 2007. Article RASSF1A Elicits Apoptosis through an MST2 Pathway Directing Proapoptotic Transcription by the p73 Tumor Suppressor Protein. , pp.962–975.
- Matsuda, T. et al., 2016. NF2 Activates Hippo Signaling and Promotes Ischemia / Reperfusion Injury in the Heart. *Molecular Medecine*, 119, pp.596–606.
- Mauch, D.H., 2001. CNS Synaptogenesis Promoted by Glia-Derived Cholesterol. *Science*, 294(5545), pp.1354–1357.
- Maurer, E. et al., 2014. Methylnitrosourea (MNU)-induced Retinal Degeneration and Regeneration in the Zebrafish: Histological and Functional Characteristics. *Journal of Visualized Experiments*, (92), p.e51909.
- Mauviel, A., Nallet-Staub, F. & Varelas, X., 2012. Integrating developmental signals : a Hippo in the (path)way. *Oncogene*, 31(14), pp.1743–1756.
- McMahon, C. et al., 1999. P/CAF associates with cyclin D1 and potentiates its activation of the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(10), pp.5382–5387.
- de Melo Reis, R. et al., 2008. Müller Glia as an Active Compartment Modulating Nervous Mu Activity in the Vertebrate Retina : Neurotransmitters and Trophic Factors. *Neurochemical Research*, 33(18), pp.1466–1474.
- Mescher, A.L., 2017. Macrophages and fibroblasts during inflammation and tissue repair in models of organ regeneration. *Regeneration*, 4(2), pp.39–53.



- Mesquida, M. et al., 2014. Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. *Clinical and Experimental Immunology*, 176(3), pp.301–309.
- Messina, A., Casarosa, S. & Murenu, E., 2011. *Stem Cells and the Retina—Challenges for Regenerative Medicine*,
- Meyers, J.R. et al., 2012.  $\beta$ -catenin/Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina. *Neural Development*, 7(1), p.30.
- Meyers, S.M. et al., 1995. Retinal changes associated with neurofibromatosis 2. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 93, pp.245–252.
- Miesfeld, J.B. et al., 2015. Yap and Taz regulate retinal pigment epithelial cell fate. *Development (Cambridge, England)*, 142(17), pp.3021–32.
- 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), pp.177–188.
- Milewski, R.C. et al., 2004. Identification of minimal enhancer elements sufficient for Pax3 expression in neural crest and implication of Tead2 as a regulator of Pax3. *Development*, 131(4), pp.829–837.
- Mills, J.O., Jalil, A. & Stanga, P.E., 2017. Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present. *Eye*, 44(January), pp.1–16.
- Mitashov, V.I., 1996. Mechanisms of retina regeneration in urodeles. *The International journal of developmental biology*, 40(4), pp.833–44.
- Miyajima, A., Tanaka, M. & Itoh, T., 2014. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell*, 14(5), pp.561–574.
- 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), pp.739–56.
- Mo, J.-S., 2017. The role of extracellular biophysical cues in modulating the Hippo-YAP pathway. *BMB Reports*, 50(2), pp.71–78.

- Mo, J.-S., Park, H.W. & Guan, K.-L., 2014. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO reports*, 15(6), pp.642–56.
- Morikawa, Y. et al., 2015. Actin cytoskeletal remodeling with protrusion formation is essential for heart regeneration in Hippo-deficient mice. *Science signaling*, 8(375), p.ra41.
- Morin-Kensicki, E.M. et al., 2006. Defects in Yolk Sac Vasculogenesis, Chorioallantoic Fusion, and Embryonic Axis Elongation in Mice with Targeted Disruption of Yap65. *Molecular and Cellular Biology*, 26(1), pp.77–87.
- Moroishi, T. et al., 2015. A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes and Development*, 29(12), pp.1271–1284.
- Morris, A.C. et al., 2005. Cone survival despite rod degeneration in XOPS-mCFP transgenic zebrafish. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(12), pp.4762–71.
- Moya, I.M. & Halder, G., 2016. The Hippo pathway in cellular reprogramming and regeneration of different organs. *Current Opinion in Cell Biology*, 43, pp.62–68.
- Müller, B. et al., 2017. Organotypic Cultures of Adult Mouse Retina: Morphologic Changes and Gene Expression. *Ophthalmol Vis Sci*, 58, pp.1930–1940.
- Müller, H., 1851. Zur Histologie der Netzhaut. *Zeitschrift für Wissenschaft und Zoologie*, 3, pp.234–237.
- Murakami, M. et al., 2005. A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5 , a transcription factor implicated in Holt – Oram syndrome.
- Murakami, M. et al., 2006. Transcriptional activity of Pax3 is co-activated by TAZ. , 339, pp.533–539.

## N

- Nagashima, M., Barthel, L.K. & Raymond, P. a, 2013. A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. *Development (Cambridge, England)*, 140(22), pp.4510–21.

- Nagelhus, E.A., Mathiisen, T.M. & Ottersen, O.P., 2004. Aquaporin-4 in the central nervous system: Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience*, 129(4), pp.905–913.
- Nakamichi, N., Chidlow, G. & Osborne, N.N., 2003. Effects of intraocular injection of a low concentration of zinc on the rat retina. *Neuropharmacology*, 45(5), pp.637–648.
- Nakazawa, T. et al., 2007. Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(6), pp.2760–2768.
- Nakazawa, T. et al., 2006. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Molecular vision*, 12(August), pp.867–78.
- Natoli, R. et al., 2017. Microglia-derived IL-1  $\beta$  promotes chemokine expression by Müller cells and RPE in focal retinal degeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 12(31), pp.1–11.
- Negishi, K. et al., 1991. Induction of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-immunoreactive cells in goldfish retina following intravitreal injection with 6-hydroxydopamine. *Cellular and molecular neurobiology*, 11(6), pp.639–659.
- Nelson, C.M. et al., 2012. Stat3 defines three populations of müller glia and is required for initiating maximal müller glia proliferation in the regenerating zebrafish retina. *Journal of Comparative Neurology*, 520(18), pp.4294–4311.
- Nelson, C.M. et al., 2013. Tumor Necrosis Factor-Alpha Is Produced by Dying Retinal Neurons and Is Required for Muller Glia Proliferation during Zebrafish Retinal Regeneration. *Journal of Neuroscience*, 33(15), pp.6524–6539.
- Nesti, E. et al., 2014. C-terminal domain small phosphatase 1 and MAP kinase reciprocally control REST stability and neuronal differentiation. , 132(3).
- Newman, E.A., 2015. Glial cell regulation of neuronal activity and blood flow in the retina by release of gliotransmitters. , 2.
- Newman, E. & Reichenbach, A., 1996. The Muller cell: A functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*, 19(8), pp.307–312.

- Ng, J., Currie, P. & Jusuf, P., 2014. The regenerative potential of the vertebrate retina: Lessons from the Zebrafish. In *Regenerative Biology of the Eye, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Humana Press, pp. 49–82.
- Ng Chi Kei, J., Currie, P.D. & Jusuf, P.R., 2017. Fate bias during neural regeneration adjusts dynamically without recapitulating developmental fate progression. *Neural Development*, 12(1), p.12.
- Nishikawa, Y. et al., 2016. Negative impact of AQP-4 channel inhibition on survival of retinal ganglion cells and glutamate metabolism after crushing optic nerve. *Experimental Eye Research*, 146, pp.118–127.
- Nishioka, N. et al., 2009. The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass. *Developmental Cell*, 16(3), pp.398–410.
- Nomura-Komoike, K. et al., 2016. DNA damage response in proliferating Müller glia in the mammalian retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(3), pp.1169–1182.
- Novikova, I.P. et al., 2008. [A study of the localization and accumulation of S-phase cells in the retina of newt *Pleurodeles waltl* after experimental pigment epithelial detachment]. *Ontogenez*, 39(2), pp.143–50.

## O

- Oka, T. et al., 2010. Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem J*, 432(3), pp.461–472.
- Omerovic, J. et al., 2004. Ligand-regulated association of ErbB-4 to the transcriptional co-activator YAP65 controls transcription at the nuclear level. , 294, pp.469–479.
- Ooto, S. et al., 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), pp.13654–13659.

Osakada, F. et al., 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), pp.4210–4219.

Otteson, D.C., D'Costa, a R. & Hitchcock, P.F., 2001. Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Developmental biology*, 232(1), pp.62–76.

Otteson, D.C. & Hitchcock, P.F., 2003. Stem cells in the teleost retina: Persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Research*, 43(8), pp.927–936.

Oudhoff, M.J. et al., 2013. Control of the Hippo Pathway by Set7-Dependent Methylation of Yap. *Developmental Cell*, 26(2), pp.188–194.

Oudhoff, M.J. et al., 2016. SETD7 Controls Intestinal Regeneration and Tumorigenesis by Regulating Wnt/ $\beta$ -Catenin and Hippo/YAP Signaling. *Developmental Cell*, 37(1), pp.47–57.

## P

Pak, T. et al., 2014. Rax-CreERT2 knock-in mice: A tool for selective and conditional gene deletion in progenitor cells and radial glia of the retina and hypothalamus. *PLoS ONE*, 9(4), pp.1–13.

Pan, D., 2010. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell*, 19(4), pp.491–505.

Pancier, T. et al., 2016. Induction of Expandable Tissue-Specific Stem/Progenitor Cells through Transient Expression of YAP/TAZ. *Cell Stem Cell*, 19(6), pp.725–737.

Pannicke, T. et al., 2010. Deletion of aquaporin-4 renders retinal glial cells more susceptible to osmotic stress. *Journal of Neuroscience Research*, 88(13), pp.2877–2888.

Pantalacci, S., Tapon, N. & Léopold, P., 2003. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in Drosophila. *Nature Cell Biology*, 5(10), pp.921–927.

Papizan, J.B. & Olson, E.N., 2014. Hippo in the Path to Heart Repair. *Circulation Research*, 115, pp.332–335.

- Park, K. et al., 2004. TAZ Interacts with TTF-1 and Regulates Expression of Surfactant Protein-C<sup>\*</sup>. , 279(17), pp.17384–17390.
- Park, R. et al., 2016. Yap is required for ependymal integrity and is suppressed in LPA-induced hydrocephalus. *Nat Commun*, 7, p.10329.
- Parry, D.M. et al., 1996. Germ-Line Mutations in the Neurofibromatosis 2 Gene : Correlations with Disease Severity and Retinal Abnormalities. *The American Journal of Human Genetics*, 59, pp.529–539.
- Paul, I. et al., 2013. Current Understanding on EGFR and Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Glioma and Their Possible Crosstalk. *Genes & cancer*, 4(11–12), pp.427–46.
- Pearson, R.A. et al., 2012. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature*, 485(7396), pp.99–103.
- Pefani, D.E. & Neill, E.O., 2016. Hippo pathway and protection of genome stability in response to DNA damage. *FEBS Journal*, 283, pp.1392–1403.
- Pellissier, L.P. et al., 2013. Targeted Ablation of Crb1 and Crb2 in Retinal Progenitor Cells Mimics Leber Congenital Amaurosis. *PLoS Genetics*, 9(12).
- Pennesi, M.E. et al., 2012. Long-Term Characterization of Retinal Degeneration in *rd1* and *rd10* Mice Using Spectral Domain Optical Coherence Tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(8), p.4644.
- Peterson, W.M. et al., 2000. Ciliary Neurotrophic Factor and Stress Stimuli Activate the Jak-STAT Pathway in Retinal Neurons and Glia. *The Journal of Neuroscience*, 20(11), pp.4081–4090.
- Piccolo, S., Dupont, S. & Cordenonsi, M., 2014. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews*, 94(4), pp.1287–312.
- Poitelon, Y. et al., 2016. YAP and TAZ control peripheral myelination and the expression of laminin receptors in Schwann cells. *Nature neuroscience*, 19(7), pp.879–887.
- Pollak, J. et al., 2013. ASCL1 reprograms mouse Muller glia into neurogenic retinal progenitors. *Development (Cambridge, England)*, 140(12), pp.2619–31.

- Porrello, E.R. et al., 2011. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. , 331(25), pp.1078–1081.
- Porrello, E.R. & Olson, E.N., 2014. A neonatal blueprint for cardiac regeneration. *Stem Cell Research*, 13(3), pp.556–570.
- Powell, C. et al., 2013. Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Müller glia genome during retina regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(49), pp.19814–9.
- Powell, C. et al., 2016. Zebrafish Müller glia-derived progenitors are multipotent, exhibit proliferative biases and regenerate excess neurons. *Scientific Reports*, 6(April), p.24851.
- Powers, S.E. et al., 2012. Subnuclear cyclin D3 compartments and the coordinated regulation of proliferation and immunoglobulin variable gene repression. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(12), pp.2199–2213.
- Praskova, M., Xia, F. & Avruch, J., 2008. MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation. *Current Biology*, 18(5), pp.311–321.

## Q

- Qin, H. et al., 2012. Transcriptional analysis of pluripotency reveals the hippo pathway as a barrier to reprogramming. *Human Molecular Genetics*, 21(9), pp.2054–2067.
- Qin, H. et al., 2016. YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell Reports*, 14(10), pp.2301–2312.
- Qin, Z., Barthel, L.K. & Raymond, P.A., 2009. Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), pp.9310–9315.
- Qin, Z. & Raymond, P.A., 2012. Microarray-based gene profiling analysis of Müller glia-derived retinal stem cells in light-damaged retinas from adult zebrafish. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 884, pp.255–61.

## R

- Raghunathan, V.K. et al., 2017. Role of Substratum Stiffness in Modulating Genes Associated with Extracellular Matrix and. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(1), pp.378–386.
- Rajaram, K. et al., 2014. MiR-203 regulates progenitor cell proliferation during adult zebrafish retina regeneration. *Developmental Biology*, 392(2), pp.393–403.
- Ramachandran, R., Fausett, B. V & Goldman, D., 2010. Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nature cell biology*, 12(11), pp.1101–1107.
- Ramachandran, R., Zhao, X.-F. & Goldman, D., 2011. Ascl1a/Dkk/ B-catenin signaling pathway is necessary and glycogen synthase kinase-3 inhibition is sufficient for zebrafish retina regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(38), pp.15858–15863.
- Ramachandran, R., Zhao, X.-F. & Goldman, D., 2012. Insm1a-mediated gene repression is essential for the formation and differentiation of Müller glia-derived progenitors in the injured retina. *Nature Cell Biology*, 14(10), pp.1013–1023.
- Ramsden, C.M. et al., 2013. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development*, 140(12), pp.2576–2585.
- Rao, M.B., Didiano, D. & Patton, J.G., 2017. Neurotransmitter-Regulated Regeneration in the Zebrafish Retina. *Stem Cell Reports*, 8(4), pp.831–842.
- Raymond, P.A., Reifler, M.J. & Rivlin, P.K., 1988. Regeneration of goldfish retina: rod precursors are a likely source of regenerated cells. *Journal of neurobiology*, 19(5), pp.431–63.
- Raymond, P. a et al., 2006. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC developmental biology*, 6, p.36.
- Del Re, D.P. et al., 2013. Yes-associated protein isoform 1 (Yap1) promotes cardiomyocyte survival and growth to protect against myocardial ischemic injury. *Journal of Biological Chemistry*, 288(6), pp.3977–3988.



- Reginensi, A. et al., 2013. Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS genetics*, 9(3), p.e1003380.
- Reh, T.A. & Pittack, C., 1995. Transdifferentiation and retinal regeneration. *Seminars in cell biology*, 6(3), pp.137–42.
- Reichenbach, A. et al., 1993. What do retinal Müller (glial) cells do for their neuronal “small siblings”? *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 6(4), pp.201–213.
- Reichenbach, A. & Bringmann, A., 2010. *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*, Springer Science & Business Media.
- Reichenbach, A. & Bringmann, A., 2013. New functions of Müller cells. *Glia*, 61(5), pp.651–678.
- Ren, A. et al., 2008. Down-regulation of Mammalian Sterile 20 – Like Kinase 1 by Heat Shock Protein 70 Mediates Cisplatin Resistance in Prostate Cancer Cells. , (7), pp.2266–2275.
- Reyes-Aguirre, L.I. & Lamas, M., 2016. Oct4 Methylation-Mediated Silencing As an Epigenetic Barrier Preventing Müller Glia Dedifferentiation in a Murine Model of Retinal Injury. *Frontiers in Neuroscience*, 10(November), p.523.
- Rhee, K. Do et al., 2013. CNTF-mediated protection of photoreceptors requires initial activation of the cytokine receptor gp130 in Muller glial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47), pp.E4520-9.
- Richardson, P.R. et al., 1996. Immunocytochemical study of retinal diode laser photocoagulation in the rat. *The British journal of ophthalmology*, 80(12), pp.1092–8.
- Del Rio, P. et al., 2011. GDNF-Induced Osteopontin from Müller Glial Cells Promotes Photoreceptor Survival in the Pde6b rd1 Mouse Model of Retinal Degeneration. , 832, pp.821–832.
- Roberge, F.G. et al., 1991. Inhibition of T lymphocyte proliferation by retinal glial Müller cells: Reversal of inhibition by glucocorticoids. *Journal of Autoimmunity*, 4(2), pp.307–314.
- Robertson, A. et al., 2017. Genetic ablation of the mammalian sterile-20 like kinase 1 (Mst1) improves cell reprogramming efficiency and increases induced pluripotent stem cell proliferation and survival. *Stem Cell Research*, 20, pp.42–49.

- Roesch, K. et al., 2008. The transcriptome of retinal Müller glial cells. *Journal of Comparative Neurology*, 509(2), pp.225–238.
- Roesch, K., Stadler, M.B. & Cepko, C.L., 2012. Gene expression changes within Müller glial cells in retinitis pigmentosa. *Molecular vision*, 18(May), pp.1197–214.
- Rosenbluh, J. et al., 2012.  $\beta$ -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*, 151(7), pp.1457–1473.
- Rutar, M. et al., 2015. Chemokine-mediated inflammation in the degenerating retina is coordinated by Müller cells, activated microglia, and retinal pigment epithelium. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), p.8.

## S

- Santinon, G., Pocaterra, A. & Dupont, S., 2016. Control of YAP/TAZ Activity by Metabolic and Nutrient-Sensing Pathways. *Trends in Cell Biology*, 26(4), pp.289–299.
- Santos-Ferreira, T.F., Borsch, O. & Ader, M., 2017. Rebuilding the Missing Part—A Review on Photoreceptor Transplantation. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 10(January), pp.1–14.
- Sardar Pasha, S.P.B. et al., 2017. Retinal cell death dependent reactive proliferative gliosis in the mouse retina. *Scientific Reports*, 7(1), p.9517.
- Sarruf, D.A. et al., 2005. Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol*, 25(22), pp.9985–9995.
- Sarup, V., Patil, K. & Sharma, S.C., 2004. Ciliary neurotrophic factor and its receptors are differentially expressed in the optic nerve transected adult rat retina. *Brain Research*, 1013(2), pp.152–158.
- Schäfer, P. & Karl, M.O., 2017. Prospective purification and characterization of Müller glia in the mouse retina regeneration assay. *Glia*, (May 2016).
- Schlegelmilch, K. et al., 2011. Yap1 acts downstream of  $\alpha$ -catenin to control epidermal proliferation. *Cell*, 144(5), pp.782–795.
- Schuettauf, F. et al., 2004. Adeno-associated viruses containing bFGF or BDNF are neuroprotective against excitotoxicity. *Current eye research*, 29(6), pp.379–86.

- Seidel, C. et al., 2007. Frequent Hypermethylation of MST1 and MST2 in Soft Tissue Sarcoma. *Molecular Carcinogenesis*, 46(January), pp.865–871.
- Seo, E. et al., 2013. Article to Maintain Stemness and Determine Cell Fate in the Osteo-Adipo Lineage. *CellReports*, 3(6), pp.2075–2087.
- Shaked, I., Ben-Dror, I. & Vardimon, L., 2002. Glutamine synthetase enhances the clearance of extracellular glutamate by the neural retina. *Journal of Neurochemistry*, 83(3), pp.574–580.
- Shao, D. et al., 2014. A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. *Nature communications*, 5, p.3315.
- Shen, W. et al., 2012. Conditional Muller Cell Ablation Causes Independent Neuronal and Vascular Pathologies in a Novel Transgenic Model. *Journal of Neuroscience*, 32(45), pp.15715–15727.
- Sherpa, T. et al., 2014. Retinal regeneration is facilitated by the presence of surviving neurons. *Developmental Neurobiology*, 74(9), pp.851–876.
- Shirai, H. et al., 2016. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(1), pp.E81-90.
- Sifuentes, C.J. et al., 2016. Rapid, dynamic activation of Müller Glial stem cell responses in Zebrafish. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(13), pp.5148–5160.
- Singhal, S. et al., 2012. Human Muller 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), pp.188–199.
- Snijders, A.M. et al., 2005. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. , pp.4232–4242.
- Solanas, G. & Benitah, S.A., 2013. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(11), pp.737–48.

- Song, H. et al., 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), pp.1431–1436.
- Song, W.-T., Zhang, X.-Y. & Xia, X.-B., 2015. Atoh7 promotes the differentiation of retinal stem cells derived from Müller cells into retinal ganglion cells by inhibiting Notch signaling. *Stem cell research & therapy*, 4(4), p.94.
- Sorrentino, G. et al., 2014. Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nature Cell Biology*, 16(4), pp.357–366.
- Steinhardt, A.A. et al., 2008. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Human Pathology*, pp.1582–1589.
- Stenkamp, D.L., 2011. The rod photoreceptor lineage of teleost fish. *Progress in retinal and eye research*, 30(6), pp.395–404.
- Strano, S. et al., 2001. Physical Interaction with Yes-associated Protein Enhances p73 Transcriptional Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(18), pp.15164–15173.
- Strettoi, E. & Masland, R.H., 1995. The organization of the inner nuclear layer of the rabbit retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(1 Pt 2), pp.875–888.
- Su, T. et al., 2015. Two-signal requirement for growth-promoting function of yap in hepatocytes. *eLife*, 2015(4), pp.1–21.
- Sudol, M. et al., 1995. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), pp.14733–14741.
- Sudol, M., 2014. Neuregulin 1-activated ERBB4 as a “dedicated” receptor for the Hippo-YAP pathway. *Science Signaling*, 7(355), p.pe29.
- Sudol, M., 2013. YAP1 oncogene and its eight isoforms. *Oncogene*, 32(33), p.3922.
- 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), pp.2145–52.

Suga, A. et al., 2014. Proliferation potential of Müller glia after retinal damage varies between mouse strains. *PLoS ONE*, 9(4).

Suryadinata, R., Sadowski, M. & Sarcevic, B., 2010. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase ( CDK ) substrates. , 30, pp.243–255.

Swiderska-Syn, M. et al., 2016. Hedgehog regulates yes-associated protein 1 in regenerating mouse liver. *Hepatology*, 64(1), pp.232–244.

## T

Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), pp.663–676.

Takahashi, Y. et al., 2005. Down-Regulation of LATS1 and LATS2 mRNA Expression by Promoter Hypermethylation and Its Association with Biologically Aggressive Phenotype in Human Breast Cancers. , 11, pp.1380–1385.

Takeda, M. et al., 2008. alpha-Aminoadipate induces progenitor cell properties of Müller glia in adult mice. , 49(3), pp.1142–1150.

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), pp.1136–1144.

Tang, Y. & Weiss, S.J., 2017. Snail/Slug-YAP/TAZ Complexes Cooperatively Regulate Mesenchymal Stem Cell Function and Bone Formation. *Cell Cycle*, 16(5), pp.399–405.

Taniguchi, K. et al., 2015. A gp130–Src–YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature*, 519(7541), pp.57–62.

Tao, G. et al., 2016. Pitx2 promotes heart repair by activating the antioxidant response after cardiac injury. *Nature*, 534(7605), pp.119–123.

Tao, Y. et al., 2015. The temporal topography of the N-Methyl- N-nitrosourea induced photoreceptor degeneration in mouse retina. *Scientific Reports*, 5(August), p.18612.

Tao, Z. et al., 2016. Lin28B promotes Müller glial cell de-differentiation and proliferation in the regenerative rat retinas. *Oncotarget*, 7(31).

- Tapon, N. et al., 2002. salvador promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell*, 110(4), pp.467–478.
- Tappeiner, C. et al., 2013. Characteristics of Rod Regeneration in a Novel Zebrafish Retinal Degeneration Model Using N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU). *PLoS ONE*, 8(8), pp.4–11.
- Tappeiner, C. et al., 2016. Inhibition of the TGF $\beta$  Pathway Enhances Retinal Regeneration in Adult Zebrafish. *Plos One*, 11(11), p.e0167073.
- Testa, F. et al., 2013. Three-year follow-up after unilateral subretinal delivery of adeno-associated virus in patients with leber congenital amaurosis type 2. *Ophthalmology*, 120(6), pp.1283–1291.
- Thomas, J.L. et al., 2012. Characterization of multiple light damage paradigms reveals regional differences in photoreceptor loss. *Experimental Eye Research*, 97(1), pp.105–116.
- Thomas, J.L. et al., 2016. Reactive gliosis in the adult zebrafish retina. *Experimental Eye Research*, 143, pp.98–109.
- Thomasy, S.M. et al., 2013. Substratum stiffness and latrunculin B modulate the gene expression of the mechanotransducers YAP and TAZ in human trabecular meshwork cells. *Experimental eye research*, 113, pp.66–73.
- Tian, Y. et al., 2007. TAZ promotes PC2 degradation through a SCF $\beta$ -Trcp E3 ligase complex. *Mol.Cell Biol.*, 27(18), pp.6383–6395.
- Todd, L. et al., 2017. BMP- and TGF $\beta$ -signaling regulate the formation of Müller glia-derived progenitor cells in the avian retina. *Glia*, (March).
- Todd, L. et al., 2015. Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) stimulates the proliferation of Müller glia-derived progenitor cells in avian and murine retinas. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 69, pp.54–64.
- Todd, L. et al., 2016. Jak/Stat signaling regulates the proliferation and neurogenic potential of Müller glia-derived progenitor cells in the avian retina. *Scientific Reports*, 6(April), p.35703.
- Todd, L. & Fischer, A.J., 2015. Hedgehog-signaling stimulates the formation of proliferating Muller glia-derived progenitor cells in the retina. *Development*, 142(15), pp.2610–2622.

- Tolentino, M.J. et al., 2002. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *American Journal of Ophthalmology*, 133, pp.373–385.
- Tout, S. et al., 1993. The role of müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*, 55(1), pp.291–301.
- Tremblay, A.M. & Camargo, F.D., 2012. Seminars in Cell & Developmental Biology Hippo signaling in mammalian stem cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 23(7), pp.818–826.
- Tsacopoulos, M. & Magistretti, P.J., 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), pp.877–85.
- Tserentsoodol, N. et al., 2006. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Molecular vision*, 12(April), pp.1306–1318.
- Turner, D.L. & Cepko, C.L., 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*, 328(6126), pp.131–6.

## U

- Udan, R.S. et al., 2003. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nature cell biology*, 5(10), pp.914–920.
- Ueki, Y. et al., 2015. A transient wave of BMP signaling in the retina is necessary for Müller glial differentiation. *Development*, 142(3), pp.533–543.
- Ueki, Y. et al., 2012. P53 is required for the developmental restriction in Müller glial proliferation in mouse retina. *Glia*, 60(10), pp.1579–89.
- Ueki, Y. et al., 2015. Transgenic expression of the proneural transcription factor *Ascl1* in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44), pp.13717–22.

Ueki, Y. & Reh, T.A., 2013. EGF stimulates Müller glial proliferation via a BMP-dependent mechanism. *Glia*, 61, pp.778–789.

Unterlauff, J.D. et al., 2014. Enhanced survival of retinal ganglion cells is mediated by Müller glial cell-derived PEDF. *Experimental Eye Research*, 127, pp.206–214.

Unterlauff, J.D. et al., 2012. Pigment epithelium-derived factor released by Müller glial cells exerts neuroprotective effects on retinal ganglion cells. *Neurochemical Research*, 37(7), pp.1524–1533.

## V

Varelas, X. et al., 2008. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. , 10(7).

Varelas, X., 2014. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*, 141(8), pp.1614–1626.

Varelas, X. & Wrana, J.L., 2012. Coordinating developmental signaling : novel roles for the Hippo pathway. *Trends in Cell Biology*, 22(2), pp.88–96.

Vassilev, A. et al., 2001. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes & development*, 15, pp.1229–1241.

Vecino, E. et al., 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, pp.1–40.

Vecino, E. & Acera, A., 2015. Development and programmed cell death in the mammalian eye. *International Journal of Developmental Biology*, 59(1–3), pp.63–71.

Veleri, S. et al., 2015. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. *Disease Models & Mechanisms*, 8(2), pp.109–129.

Verardo, M.R. et al., 2008. Abnormal reactivity of Müller cells after retinal detachment in mice deficient in GFAP and vimentin. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(8), pp.3659–3665.



Vergara, M.N. & Del Rio-Tsonis, K., 2009. Retinal regeneration in the *Xenopus laevis* tadpole: a new model system. *Molecular vision*, 15, pp.1000–13.

Vihtelic, T.S. et al., 2006. Retinal regional differences in photoreceptor cell death and regeneration in light-lesioned albino zebrafish. *Experimental Eye Research*, 82(4), pp.558–575.

Vihtelic, T.S. & Hyde, D.R., 2000. Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *Journal of Neurobiology*, 44(3), pp.289–307.

Vogel, V. & Sheetz, M., 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. , 7(April), pp.265–275.

## W

Wada, K.-I. et al., 2011. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*, 138(18), pp.3907–3914.

Wahl, V. et al., 2013. Osteopontin inhibits osmotic swelling of retinal glial (Müller) cells by inducing release of VEGF. *Neuroscience*, 246, pp.59–72.

Walko, G. et al., 2017. A genome-wide screen identifies YAP/WBP2 interplay conferring growth advantage on human epidermal stem cells. *Nature Communications*, 8, pp.1–16.

Walsh, N., Valter, K. & Stone, J., 2001. Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina. *Experimental eye research*, 72(5), pp.495–501.

Wan, J. et al., 2008. Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Research*, 48(2), pp.223–234.

Wan, J. et al., 2014. Retinal injury, growth factors, and cytokines converge on  $\beta$ -catenin and pStat3 signaling to stimulate retina regeneration. *Cell reports*, 9(1), pp.285–97.

Wan, J. et al., 2007. Sonic hedgehog promotes stem-cell potential of Müller glia in the mammalian retina. *Biochemical and biophysical research communications*, 363(2), pp.347–54.

- Wan, J. & Goldman, D., 2017. Opposing Actions of Fgf8a on Notch Signaling Distinguish Two Müller Glial Cell Populations that Contribute to Retina Growth and Regeneration. *Cell Reports*, 19(4), pp.849–862.
- Wan, J. & Goldman, D., 2016. Retina regeneration in zebrafish. *Current Opinion in Genetics and Development*, 40(Figure 1), pp.41–47.
- Wan, J., Ramachandran, R. & Goldman, D., 2012. HB-EGF Is Necessary and Sufficient for Müller Glia Dedifferentiation and Retina Regeneration. *Developmental Cell*, 22(2), pp.334–347.
- Wang, J. et al., 2016. NGF increases VEGF expression and promotes cell proliferation via ERK1 / 2 and AKT signaling in Müller cells. *Molecular Vision*, 22, pp.254–263.
- Wang, J.-S. et al., 2009. Intra-retinal visual cycle required for rapid and complete cone dark adaptation. *Nature neuroscience*, 12(3), pp.295–302.
- Wang, J.S. & Kefalov, V.J., 2011. The Cone-specific visual cycle. *Progress in Retinal and Eye Research*, 30(2), pp.115–128.
- Wang, K. et al., 2009. YAP, TAZ, and Yorkie: a conserved family of signal-responsive transcriptional coregulators in animal development and human disease This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled CSBMCB's 51st Annual Meeting – Epigeneti. *Biochemistry and Cell Biology*, 87, pp.77–91.
- Wang, M. et al., 2011. Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), p.173.
- Wang, M. & Wong, W.T., 2010. Microglia-Müller Cell Interactions in the Retina. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 664(Hargrave 2001), pp.333–338.
- Wang, P. et al., 2011. PP1A-mediated dephosphorylation positively regulates YAP2 activity. *PLoS ONE*, 6(9), pp.1–8.
- Wang, W. et al., 2015. AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nature Cell Biology*, 17(4), pp.490–499.

- Wang, Y. et al., 2015. Pigment epithelium-derived factor regulates glutamine synthetase and l-glutamate/l-aspartate transporter in retinas with oxygen-induced retinopathy. *Curr Eye Res*, 40(12), pp.1232–1244.
- Wang, Y., Yu, A. & Yu, F.-X., 2017. The Hippo pathway in tissue homeostasis and regeneration. *Protein & Cell*.
- Webb, C. et al., 2011. Structural features and ligand binding properties of tandem WW domains from YAP and TAZ, nuclear effectors of the hippo pathway. *Biochemistry*, 50(16), pp.3300–3309.
- Wen, R. et al., 2012. CNTF and retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(2), pp.136–151.
- Wetts, R. & Fraser, S.E., 1988. Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4844), pp.1142–5.
- Wexler, E.M., Berkovich, O. & Nawy, S., 1998. Role of the low-affinity NGF receptor (p75) in survival of retinal bipolar cells. *Vis Neurosci*, 15(2), pp.211–218.
- Weyden, L. Van Der et al., 2012. Loss of Rassf1a Synergizes with Deregulated Runx2 Signaling in Tumorigenesis. , 1(8), pp.3817–3828.
- White, D.T. et al., 2017. Immunomodulation-accelerated neuronal regeneration following selective rod photoreceptor cell ablation in the zebrafish retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.201617721.
- Wilken, M.S. & Reh, T.A., 2016. Retinal regeneration in birds and mice. *Current Opinion in Genetics and Development*, 40, pp.57–64.
- Williamson, K.A. et al., 2014. Heterozygous loss-of-function mutations in YAP1 cause both isolated and syndromic optic fissure closure defects. *American Journal of Human Genetics*, 94(2), pp.295–302.
- Winkler, B.S. et al., 2000. Energy metabolism in human retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(10), pp.3183–3190.
- Wohl, S.G. & Reh, T.A., 2016. miR-124-9-9\* potentiates Ascl1-induced reprogramming of cultured Müller glia. *Glia*, 64(5), pp.743–762.

- Wrighton, K.H., 2014. Metabolism: YAP and TAZ under metabolic control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(5), pp.296–297.
- Wu, D.M. et al., 2001. Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(9), pp.2115–2124.
- Wu, H. et al., 2013. The Ets Transcription Factor GABP Is a Component of the Hippo Pathway Essential for Growth and Antioxidant Defense. *Cell Reports*, 3(5), pp.1663–1677.
- Wu, Q. et al., 2017. YAP / TAZ-mediated activation of serine metabolism and methylation regulation is critical for LKB1-deficient breast cancer progression. *Bioscience Reports*, 37, pp.1–6.
- Wu, S. et al., 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), pp.445–456.
- Wu, S. et al., 2008. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Developmental cell*, 14(3), pp.388–398.

## X

- Xiao, J. et al., 2017. Apobec1 Promotes Neurotoxicity-Induced Dedifferentiation of Müller Glial Cells. *Neurochemical Research*, 42(4), pp.1151–1164.
- Xie, B. et al., 2012. Effect of pigment epithelium-derived factor on glutamate uptake in retinal müller cells under high-glucose conditions. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(2), pp.1023–1032.
- Xin, M. et al., 2013. Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(34), pp.13839–13844.
- Xin, M. et al., 2011. Regulation of insulin-like growth factor signaling by Yap governs cardiomyocyte proliferation and embryonic heart size. *Science signaling*, 4(196), p.ra70.
- Xu, T. et al., 1995. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. *Development*, 121(4), pp.1053–63.

Xue, W. et al., 2011. Ciliary neurotrophic factor induces genes associated with inflammation and gliosis in the retina: A gene profiling study of flow-sorted, müller cells. *PLoS ONE*, 6(5).

## Y

Yafai, Y. et al., 2013. Basic Fibroblast Growth Factor Contributes to a Shift in the Angioregulatory Activity of Retinal Glial (Müller) Cells. *PLoS ONE*, 8(7).

Yagi, R. et al., 1999. A WW domain-containing Yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO Journal*, 18(9), pp.2551–2562.

Yan, F. et al., 2017. ErbB4 protects against neuronal apoptosis via activation of YAP/PIK3CB signaling pathway in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Experimental Neurology*, 297(July), pp.92–100.

Yan, Q. et al., 2001. Regulation of retinal capillary cells by basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, and hypoxia. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*, 37(1), pp.45–49.

Yao, K. et al., 2016. Wnt Regulates Proliferation and Neurogenic Potential of Müller Glial Cells via a Lin28/let-7 miRNA-Dependent Pathway in Adult Mammalian Retinas. *Cell Reports*, 17(1), pp.165–178.

Yi, J. et al., 2016. LATS1 and LATS2 regulate mouse liver progenitor cell proliferation and maturation through antagonism of the coactivators YAP and TAZ. *Hepatology*, 64(5), pp.1757–1772.

Yimlamai, D. et al., 2014. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell*, 157(6), pp.1324–1338.

Yimlamai, D., Fowl, B.H. & Camargo, F.D., 2015. Emerging evidence on the role of the Hippo/YAP pathway in liver physiology and cancer. *Journal of Hepatology*, 63(6), pp.1491–1501.

Yoshida, S. et al., 2001. Interleukin-6 ( IL-6 ) production by cytokine-stimulated human Müller cells. *Current Eye Research*, 6(5), pp.7–8.

- Yoshida, S., Yoshida, A. & Ishibashi, T., 2004. Induction of IL-8, MPC-1, and bFGF by TNF $\alpha$  in retinal glial cells: Implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 242(5), pp.409–413.
- Yoshii, C. et al., 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), pp.45–56.
- Yu, D.Y. et al., 2000. Intraretinal oxygen levels before and after photoreceptor loss in the RCS rat. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(12), pp.3999–4006.
- Yu, F.-X. et al., 2015. Hippo Pathway Regulation of Gastrointestinal Tissues. *Annual review of physiology*, 77, pp.201–227.
- Yu, F.X., Zhao, B. & Guan, K.L., 2015. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell*, 163(4), pp.811–828.
- Yurco, P. & Cameron, D.A., 2005. Responses of Müller glia to retinal injury in adult zebrafish. *Vision Research*, 45(8), pp.991–1002.

## Z

- Zack, D.J., 2000. Neurotrophic Rescue of Photoreceptors. *Neuron*, 26(2), pp.285–286.
- Zaidi, S.K. et al., 2004. Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription. *The EMBO journal*, 23(4), pp.790–9.
- Zanconato, F., Cordenonsi, M. & Piccolo, S., 2016. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*, 29(6), pp.783–803.
- Zelinka, C.P. et al., 2016. mTor-signaling is required for the formation of proliferating Müller glia-derived progenitor cells in the chick retina. *Development*, (April), pp.1859–1873.
- Zelinka, C.P. et al., 2012. The reactivity, distribution and abundance of Non-astrocytic Inner Retinal Glial (NIRG) cells are regulated by microglia, acute damage, and IGF1. *PloS one*, 7(9), p.e44477.

- Zender, L. et al., 2006. Identification and Validation of Oncogenes in Liver Cancer Using an Integrative Oncogenomic Approach. , pp.1253–1267.
- Zhang, H. et al., 2012. Negative regulation of Yap during neuronal differentiation. *Developmental Biology*, 361(1), pp.103–115.
- Zhang, H. et al., 2009. TEAD Transcription Factors Mediate the Function of TAZ in Cell Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition \* □. , 284(20), pp.13355–13362.
- Zhang, H., Pasolli, H.A. & Fuchs, E., 2011. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(6), pp.2270–2275.
- Zhang, K. et al., 2015. YAP and TAZ Take Center Stage in Cancer. *Biochemistry*, 54, pp.6555–6566.
- Zhang, L. et al., 2008. Article The TEAD / TEF Family of Transcription Factor Scalloped Mediates Hippo Signaling in Organ Size Control. , (March), pp.377–387.
- Zhang, N. et al., 2010. The Merlin/NF2 Tumor Suppressor Functions through the YAP Oncoprotein to Regulate Tissue Homeostasis in Mammals. *Developmental Cell*, 19(1), pp.27–38.
- Zhang, W. et al., 2014. VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell research*, 24(3), pp.331–43.
- Zhang, Y. & Del Re, D.P., 2017. A growing role for the Hippo signaling pathway in the heart. *Journal of Molecular Medicine*, 95(5), pp.465–472.
- Zhao, B. et al., 2010. A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF $\beta$ -TRCP. *Genes and Development*, 24(1), pp.72–85.
- Zhao, B. et al., 2012. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes and Development*, 26(1), pp.54–68.
- Zhao, B. et al., 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, pp.2747–2761.

- Zhao, B. et al., 2008. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes & Development*, pp.1962–1971.
- Zhao, B., Lei, Q.Y. & Guan, K.L., 2009. Harness the Power: New Insights into the Inhibition of YAP/Yorkie. *Developmental Cell*, 16(3), pp.321–322.
- 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), pp.877–883.
- Zhao, J.J. et al., 2014. Induction of retinal progenitors and neurons from mammalian müller glia under defined conditions. *Journal of Biological Chemistry*, 289(17), pp.11945–11951.
- Zhao, X.-F. et al., 2014. Leptin and IL-6 family cytokines synergize to stimulate Müller glia reprogramming and retina regeneration. *Cell reports*, 9(1), pp.272–84.
- Zheng, X. et al., 2017. LncRNA wires up Hippo and Hedgehog signaling to reprogramme glucose metabolism. *The EMBO journal*, p.e201797609.
- Zhi, X., Zhao, D. & Zhou, Z., 2012. YAP Promotes Breast Cell Proliferation and Survival Partially through Stabilizing the KLF5 Transcription Factor. *AJPA*, 180(6), pp.2452–2461.
- Zhou, D. et al., 2009. Mst1 and Mst2 Maintain Hepatocyte Quiescence and Suppress Hepatocellular Carcinoma Development through Inactivation of the Yap1 Oncogene. *Cancer Cell*, 16(5), pp.425–438.
- Zhou, D. et al., 2011. Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition of Yes-associated protein (Yap) overabundance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49), pp.E1312–E1320.
- Zhou, Q. et al., 2015. The hippo pathway in heart development, regeneration, and diseases. *Circulation research*, 116(8), pp.1431–47.
- Zhou, X. et al., 2009. Anti-inflammatory effect of pigment epithelium-derived factor in DBA / 2J mice. *Molecular Vision*, 15(December 2008), pp.438–450.
- Zhu, C., Li, L. & Zhao, B., 2015. The regulation and function of YAP transcription co-activator. , 47(December 2014), pp.16–28.





---

# ANNEXES

---



# Müller Glial Cell-Dependent Regeneration of the Neural Retina: An Overview Across Vertebrate Model Systems

Annaïg Hamon,<sup>1,2</sup> Jérôme E. Roger,<sup>1,2</sup> Xian-Jie Yang,<sup>3</sup> and Muriel Perron<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Paris-Saclay Institute of Neuroscience, CNRS, Univ Paris Sud, Université Paris-Saclay, Orsay, France

<sup>2</sup>Centre d'Etude et de Recherche Thérapeutique en Ophtalmologie, Retina France, Orsay, France

<sup>3</sup>Stein Eye Institute, University of California Los Angeles, Los Angeles, California

Retinal dystrophies are a major cause of blindness for which there are currently no curative treatments. Transplantation of stem cell-derived neuronal progenitors to replace lost cells has been widely investigated as a therapeutic option. Another promising strategy would be to trigger self-repair mechanisms in patients, through the recruitment of endogenous cells with stemness properties. Accumulating evidence in the past 15 year0s has revealed that several retinal cell types possess neurogenic potential, thus opening new avenues for regenerative medicine. Among them, Müller glial cells have been shown to be able to undergo a reprogramming process to re-acquire a stem/progenitor state, allowing them to proliferate and generate new neurons for repair following retinal damages. Although Müller cell-dependent spontaneous regeneration is remarkable in some species such as the fish, it is extremely limited and ineffective in mammals. Understanding the cellular events and molecular mechanisms underlying Müller cell activities in species endowed with regenerative capacities could provide knowledge to unlock the restricted potential of their mammalian counterparts. In this context, the present review provides an overview of Müller cell responses to injury across vertebrate model systems and summarizes recent advances in this rapidly evolving field. *Developmental Dynamics* 00:000–000, 2016. © 2015 The Authors. Developmental Dynamics published by Wiley Periodicals, Inc.

**Key words:** retina; stem cells; Müller cells; regeneration

Submitted 7 October 2015; First Decision 12 November 2015; Accepted 22 November 2015; Published online 0 Month 2015

## Introduction

Vision loss is a major social, medical, and economical issue, affecting millions of people around the world. Neurodegenerative diseases of the retina involve the progressive and irreversible loss of retinal neurons, leading to impaired visual function. These retinal dystrophies include retinitis pigmentosa, age-related macular degeneration, glaucoma, and diabetic retinopathy. Despite being a major cause of disability, there are only limited therapeutic options that can slow down the progression of some of these diseases, but no viable treatments so far. The recent progress in stem cell research has opened new avenues for cell-based therapies. For instance, major advances regarding cell transplantation strategies have been made using exogenous photoreceptors derived from embryonic or induced pluripotent stem cells (West et al., 2009; Perron et al., 2012; Jayakody et al., 2015). However, tremendous challenges exist to achieve integration and reconstitution of the retinal network from exogenous cell sources. An

alternative and attractive therapeutic strategy is to stimulate the patient's endogenous retinal stem-(like) cells to replace lost neuronal cells. This self-repair process commonly used by several vertebrate species is the focus of the present review.

The anatomical structure of the retina, its cellular composition, as well as the order in which the various retinal cell types are produced during development, are highly conserved across all vertebrates (Livesey and Cepko, 2001). However, the regenerative modalities and capacities are tremendously different among vertebrate classes and even between species in a given class. In contrast to mammals, which have none or very limited regenerative capacities, efficient endogenous repair occurs following retinal damage in a variety of nonmammalian vertebrates (Moshiri et al., 2004; Stenkamp, 2007; Lamba et al., 2008, 2009; Karl and Reh, 2010; Bockerhoff and Fadool, 2011; Gemberling et al., 2013; Hidalgo et al., 2014). In addition to the contrasting regenerative efficiencies reported in different animal models, distinct modalities of regeneration have been identified based on the cellular sources involved. These sources include the retinal pigment epithelium (RPE, the cell layer overlying the neural retina), the ciliary margin (the peripheral region that contains retinal stem cells)

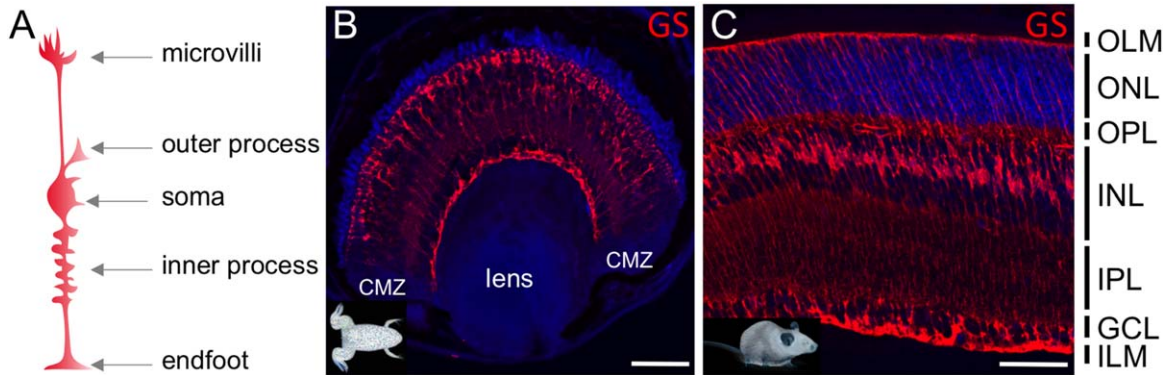
This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Grant sponsor: NIH/NEI; Grant number: 2P30 EY000331-48.

\*Correspondence to: Muriel Perron, Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Bat 445, Univ Paris Sud, 91405 Orsay, France. E-mail: muriel.perron@u-psud.fr

Article is online at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.24375/abstract>

© 2016 The Authors. Developmental Dynamics published by Wiley Periodicals, Inc.



**Fig. 1.** Müller glial cells. **A:** Schema of Müller glial cell morphology. **B,C:** Immunofluorescence analysis of glutamine synthetase (GS, red), a Müller glial cell marker, on transversal sections of stage 45 *Xenopus laevis* tadpole (B) and postnatal day 10 mouse (C) retina. Cell nuclei are counterstained with DAPI (blue). Although Müller cells from different species may vary in shape, these images illustrate some common features. It shows how the radially oriented processes of Müller cells span the entire thickness of the retina. Their soma resides in the inner nuclear layer (INL), while their apical (microvilli) and basal processes (endfeet) project to the outer or the inner limiting membranes (OLM and INL), respectively. CMZ, ciliary marginal zone; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bar: 50  $\mu$ M.

and Müller glial cells. Here, we focus exclusively on the latter given the spectacular upsurge of interest in the regenerative potential of these cells across species in recent years, with the aim to provide an overview of this rapidly evolving field (Ahmad et al., 2011; Belecky-Adams et al., 2013; Karl, 2013; Gallina et al., 2014a; Goldman, 2014; Gorsuch and Hyde, 2014; Lenkowski and Raymond, 2014; Ng et al., 2014; Jayakody et al., 2015).

## The Müller Cell: More than Just a Glial Cell

Müller glia, named after their discoverer, the German anatomist Heinrich Müller, were first described in 1851 as radial fibers in the fish, frog, and pigeon retina (Müller, 1851; Reichenbach and Bringmann, 2010) (Fig. 1). Müller glia represents approximately 4–5% of retinal cells (Strettoi and Masland, 1995; Jeon et al., 1998). They span the entire thickness of the retina, allowing for a symbiotic relationship with adjacent neurons. Indeed, Müller cells play a wide variety of roles that contribute to the maintenance of retinal homeostasis and visual function, including a trophic support for retinal neurons (Bringmann et al., 2006; Reichenbach and Bringmann, 2010) and as a second source of visual pigment regeneration especially for cone photoreceptors (Kaylor et al., 2013, 2014).

Müller cells are the only type of retinal glia that share a common embryonic origin with retinal neurons (Turner and Cepko, 1987; Holt et al., 1988; Wetts and Fraser, 1988). Of note, a recent lineage study in the mouse suggests that a subset of Müller cells may be derived from the neural crest (Liu et al., 2014). This is quite unexpected and thus clearly deserves further investigation and comparative studies in different vertebrate species.

Müller cells are among the latest cells to be born during development in all vertebrate retinas. Transcriptomic analyses revealed great similarities between the molecular repertoire of Müller glia and multipotent late retinal progenitors (Blackshaw et al., 2004; Livesey et al., 2004; Roesch et al., 2008; Jadhav et al., 2009). Müller glia thus acquire some specialized glial functions but maintain a molecular signature of late stage progenitor cells (Jadhav et al., 2009). Such similarity could explain the remarkable properties of these cells to acquire a stem-like state and serve as a source of retinal neurons in case of injury in certain species.

Below, we review recent advances in this area, highlighting similarities and differences in Müller cell response to retinal damage in various vertebrate classes.

## Müller Cell Response to Injury in Fish

### Müller Cells Are Involved in Adult Neurogenesis

As fish grow continuously throughout their lives, their retinas not only stretch but also constantly generate new neurons to keep pace with the enlarging body. It has been long understood that this adult neurogenesis occurs in a germinal zone at the margin of the retina (Johns, 1977). The presence of genuine retinal stem cells in this peripheral region, so-called ciliary marginal zone (CMZ), has recently been demonstrated (Centanin et al., 2011). The CMZ, however, is not the only site of adult neurogenesis in the fish retina. New rod photoreceptors are generated from resident proliferative cells in the inner nuclear layer of the central retina (Johns and Fernald, 1981; Johns, 1982; Julian et al., 1998; Otteson et al., 2001; Otteson and Hitchcock, 2003). The identity of these cells remained a mystery for many years until lineage tracing studies in 2006 formally revealed their Müller glial cell of origin (reviewed in Lenkowski and Raymond, 2014). In the post-embryonic fish, Müller cells divide slowly and sporadically to generate fate-restricted rod progenitors that supply the growing retina with new rod photoreceptors.

### Müller Cells Are Involved in Retinal Regeneration

The initial evidence of effective retinal regeneration in teleosts was provided in adult goldfish following surgical removal of one quadrant of the neural retina (Lombardo, 1968). Additional studies of this phenomenon in goldfish and zebrafish clearly demonstrated the replacement of all missing neurons after different methods of injury such as cytotoxic lesion (Maier and Wolburg, 1979; Raymond et al., 1988; Negishi et al., 1991), surgical approach (Hitchcock et al., 1992), laser or light damage (Braisted et al., 1994; Vihtelic and Hyde, 2000). As expected from the known sites of normal adult neurogenesis, two cellular sources of regeneration were identified, the CMZ and the resident proliferative cells of the inner nuclear layer that were at the time not yet

identified as Müller cells (Maier and Wolburg, 1979; Raymond et al., 1988). In the early 2000s, many studies showed that Müller glia respond to injuries, in particular through their increased proliferation (Vihtelic and Hyde, 2000; Wu et al., 2001; Yurco and Cameron, 2005; Raymond et al., 2006; Vihtelic et al., 2006). Later, using cell lineage-tracing studies in transgenic fish, Müller glia were formally recognized as the major source of endogenous stem cells for retinal regeneration (Fausett and Goldman, 2006; Bernardos et al., 2007; Fimbel et al., 2007). Although proliferating Müller cells only give rise to rod photoreceptors under physiological conditions (as mentioned above), they regenerate all types of retinal neurons following injury (Stenkamp, 2011).

### Müller Cell Behavior in a Regenerating Retina

Müller glia cells respond locally and rapidly to injury. They first exhibit reactive gliosis, before initiate the regenerative program (Thomas et al., 2015). Because Müller glia in the adult zebrafish retina can be considered to be multipotent stem cells, it has been argued that they do not require a “reprogramming” event in the classic sense (Lenkowski and Raymond, 2014). Nevertheless, they undergo changes in gene expression which enable the re-acquisition of a progenitor-like state (reviewed in Goldman, 2014). However, it should be noted that Müller glia in the damaged fish retina do not dedifferentiate completely (see below). Among up-regulated genes in injury-responsive Müller cells, some well-known reprogramming factors have been identified, such as *Ascl1*, *Lin-28*, and *Stat3* (Kassen, 2007; Fausett et al., 2008; Ramachandran et al., 2010). They form a regulatory cascade: *Ascl1* and *Stat3* positively regulate each other while *Ascl1* acts upstream of *Lin-28*, which represses the micro-RNA *let-7*, a repressor of regeneration-associated genes (Ramachandran et al., 2010; Nelson et al., 2012). Further work is needed to shed more light on the intricate genetic networks involved in Müller cell activation since transcriptional gene profiling in isolated Müller glia revealed close to a thousand transcripts differentially regulated after retinal injury (Qin et al., 2009; Qin and Raymond, 2012).

The dedifferentiation process of Müller cells likely involves epigenetic modifications, as expected from our knowledge of somatic cell reprogramming during induced pluripotent stem (iPS) cell generation (Krishnakumar and Blelloch, 2013). Dynamic changes in DNA methylation were indeed shown to underlie Müller cell response to injury (Powell et al., 2013). However, the promoters of pluripotency factors were surprisingly found to be already hypomethylated in quiescent Müller cells (Powell et al., 2013). This appears consistent with the aforementioned idea that Müller cells retain certain progenitor-like features and are therefore poised to re-enter the cell cycle in case of injury. This hypomethylation likely facilitates the dedifferentiation process and therefore enables a quick response to retinal injury (Powell et al., 2013).

Similar to retinal progenitor cells during development, responsive Müller cells exhibit interkinetic nuclear movements, with their nuclei migrating apically to undergo mitosis (Lahne et al., 2013; Nagashima et al., 2013). Activated Müller cells undergo a single asymmetric division to self-renew and produce a proliferating retinal progenitor (Nagashima et al., 2013; Lenkowski and Raymond, 2014) (Fig. 2). The newly formed daughter cell divides rapidly and repeatedly to generate a cluster of progenitor cells. These migrate, basally or apically according to the cell type that need to be replaced, along the radial processes that the dediffer-

entiated Müller cell has preserved (Fausett and Goldman, 2006; Bernardos et al., 2007; Stenkamp, 2011; Nagashima et al., 2013). The fact that these activated Müller cells retain a radial shape throughout the regenerative response likely participates in preserving the cytoarchitecture of the retina (Lenkowski and Raymond, 2014). Cells in the active Müller cell-derived clusters then differentiate and generate new neurons for retinal repair, retinal ganglion cells in case of ouabain-induced cytotoxicity or photoreceptors in case of light damages (Nagashima et al., 2013).

### Influence of the Injury Paradigm

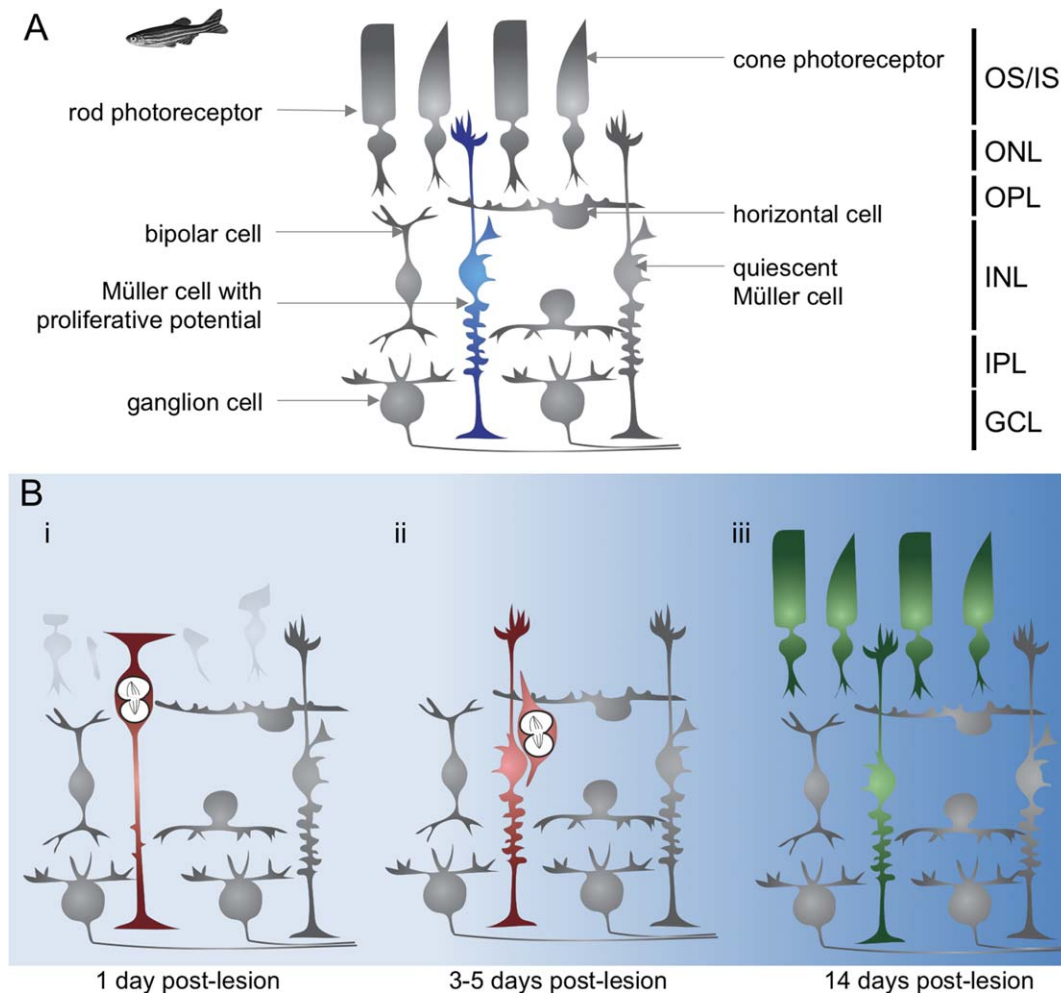
The location and extent of Müller cell activation has been compared in multiple injury models affecting different classes of retinal neurons (reviewed in Ng et al., 2014). Müller cells re-enter the cell cycle at the site of the injury but proliferation differentially spreads out depending on the lesional paradigm (Yurco and Cameron, 2005). Furthermore, there is a correlation between the amount of cell proliferation and the extent of photoreceptor cell death (Vihtelic et al., 2006; Thomas et al., 2012). In the case of severe and extensive damages, new neurons are overproduced by Müller cells, leading to histological defects (Sherpa et al., 2014). In addition, Müller glia response is slower after the loss of inner neurons than after photoreceptor cell death (Nagashima et al., 2013). Taken together, these observations strongly suggest that the type and extent of retinal insults likely lead to the release of different types/amounts of signals at the injury site and that Müller cell are differentially sensitive and responsive to this changing microenvironment.

### Extrinsic Signals Triggering Müller Cell Activation

Although the molecular mechanisms driving Müller glia response to injury in fish are still poorly understood, advances these last few years allowed the identification of a variety of extrinsic cues and signaling pathways involved in this process (Fig. 3). Apoptotic cells constitute a potential source of diffusible molecules in the damaged retina. Following zebrafish retina injury, the secreted pro-inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) is produced by dying retinal neurons and triggers Müller cell dedifferentiation and proliferation (Nelson et al., 2013). Moreover, it has been proposed that the subsequent increase of TNF $\alpha$  expression in Müller cells themselves drives the generation of a secondary population of proliferating Müller glia. Regarding the downstream pathway, TNF $\alpha$  was shown to impinge on *Stat3* and *Ascl1* genes in Müller cells (Nelson et al., 2013).

The phagocytic capacity of fish Müller glial cells was first demonstrated *in vitro* but such activity had not been observed *in vivo* (Wagner and Raymond, 1991). It has since been shown that Müller cells respond to photoreceptor cell death by engulfing remnant debris of apoptotic rods *in vivo* (Morris et al., 2005; Thomas et al., 2015), as previously reported in mammals (Egenseperger et al., 1996). Such phagocytic activity was shown to be essential to trigger Müller glia proliferation but independently of *Ascl1* and *Stat3* expression regulation (Bailey et al., 2010). An alternate underlying molecular mechanism (or interpretation) thus remains to be discovered.

Recent studies demonstrated that Müller glia cells are a source of growth factors and cytokines that regulate their own regenerative response in an autocrine/paracrine manner (Wan et al., 2014; Zhao et al., 2014a). These include interleukin-6 family

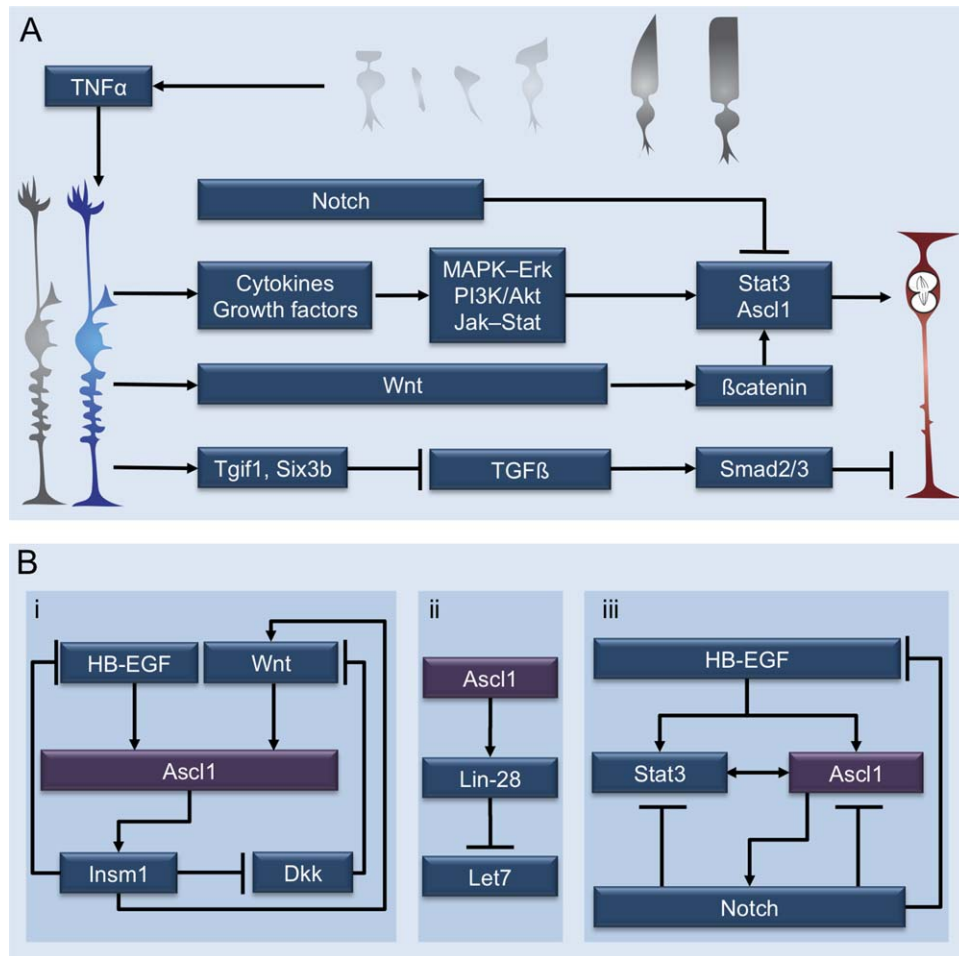


**Fig. 2.** Müller cell response to light-induced retinal damage in zebrafish. **A:** Schematic of the different cell type organization in the zebrafish retina. OS/IS, outer and inner segments of rods and cones; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; NFL, optic nerve fiber layer. **B:** (i) Intense light exposure causes selective loss of photoreceptors (light grey) in the larval or adult zebrafish retina. Such injury triggers the dedifferentiation of a subset of Müller cells (in blue in panel A), which re-enter the cell cycle (red). The mitosis occurs apically as the injury-induced Müller nuclei undergo interkinetic nuclear migration. (ii) The injury-induced Müller glia divides only once, asymmetrically, in a self-renewing mode that preserves the differentiated Müller glia cell and produces a multipotent retinal progenitor (both in red). This progenitor divides rapidly and repeatedly to generate a neurogenic cluster of cells tightly associated with the radial processes of the dedifferentiated Müller cell. (iii) The daughter cells in the cluster migrate and differentiate to replace lost photoreceptor cells (in green). Given that injury-induced Müller cells self-renew (in green), the total number of Müller glia returns to normal in the regenerated retina.

cytokines and growth factors, such as insulin, insulin-like growth factor-1, fibroblast growth factor (FGF), and HB-EGF. All these factors are present only in reactivated, not quiescent, zebrafish Müller cells (Wan et al., 2014; Zhao et al., 2014a). These factors exhibit extensive crosstalk and converge through the MAPK–Erk, PI3K/Akt, and Jak–Stat signaling cascades on *Ascl1* and *Stat3* gene regulation to promote Müller glia dedifferentiation and proliferation (Kassen et al., 2009; Wan et al., 2012, 2014; Zhao et al., 2014a).

Wnt signaling appears to be another major pathway mediating growth factors and cytokines effect on Müller cell response to injury (Wan et al., 2014). Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is activated in Müller glial cells following retinal damage and is necessary for their dedifferentiation and proliferation (Ramachandran et al., 2011; Meyers et al., 2012). A positive feedback loop occurs between Wnt signaling and *Ascl1*: ASCL1

inhibits the expression of the Wnt signaling inhibitor Dkk and stimulates the expression of Wnt4a ligand, while Wnt signaling pathway promotes *Ascl1* expression in activated Müller cells (Ramachandran et al., 2011). The transcriptional repressor *Insm1* is likely the molecular effector of the *Ascl1*-dependent repression of Dkk (Ramachandran et al., 2012; Gorsuch and Hyde, 2014). Yet, *Insm1* seems to play multiple roles during regeneration as it has also been shown to restrict the response of Müller cells by negatively regulating *hb-egf* expression (Ramachandran et al., 2012). Notch signaling was also reported to be part of a negative feedback loop in injury-responsive Müller cells (Wan et al., 2012). Notch is known to be important for the stabilization of the glial identity of Müller cells in the intact zebrafish retina (Nelson et al., 2011). In the injured adult retina, it is activated by the HB-EGF/MAPK/ASCL1-signalling cascade while inhibiting *Stat3*, *Ascl1*, and *hb-egf* expression (Wan et al., 2012). By repressing



**Fig. 3.** Signaling pathways regulating Müller glia cell dedifferentiation and proliferation following retinal injury in zebrafish. **A:** Dying photoreceptors (light grey) secrete TNF $\alpha$ , which triggers Müller cell response to injury. Activated Müller glia cells (in blue) are a source of growth factors and cytokines, which impinge on *Stat3* and *Ascl1* genes through the MAPK-Erk, PI3K/Akt, and Jak-Stat signaling cascades. *Ascl1* and *Stat3* promote Müller glia dedifferentiation and proliferation (in red). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway is also activated in Müller glia cells following retinal damage and promotes *Ascl1* expression. On the other hand, Notch inhibits *Ascl1/Stat3* expression and thereby preserves a pool of quiescent Müller glia in the injured retina. Smad2/3-mediated TGF $\beta$  signaling also inhibits the proliferative response of Müller glia following photoreceptor destruction. Although an initial increase in TGF $\beta$  signaling occurs in Müller cells following injury, its subsequent inhibition by the corepressors Tgif1 and Six3b promotes Müller glia proliferation. **B:** Illustration of regulatory cascades involving *Ascl1* gene in zebrafish Müller cells following injury. **i:** Wnt signaling and ASCL1 are part of a feedback loop: Wnt signaling promotes *Ascl1* expression in activated Müller cells. ASCL1 is upstream of the transcriptional repressor *Insm1*, which inhibits the expression of the Wnt signaling inhibitor *Dkk* and stimulates the expression of *Wnt4a* ligand. On the other hand, *Insm1* also restricts the response of Müller cells by negatively regulating *hb-egf* expression. **ii:** ASCL1 acts upstream of *Lin-28*, which represses the micro-RNA *let-7*, a repressor of regeneration-associated genes. **iii:** Notch signaling and ASCL1 are part of a negative feedback loop. Notch signaling is activated by the HB-EGF/MAPK/ASCL1-signalling cascade but inhibits *Stat3*, *Ascl1* and *hb-egf* expression.

these key reprogramming factors, Notch signaling preserves a pool of quiescent Müller glia in the injured retina. This may ensure a fine-tuning of the number of activated Müller cells able to re-enter the cell cycle, according to the extent of the injury (Wan et al., 2012; Conner et al., 2014). Finally, it was shown that Smad2/3-mediated TGF $\beta$  signaling inhibits the proliferative response of Müller glia following photoreceptor loss (Lenkowski et al., 2013). The authors proposed that although an initial increase in TGF $\beta$  signaling is important for the damage response of Müller cells, its subsequent inhibition by the corepressors Tgif1 and Six3b is necessary to promote their proliferation and therefore support the regeneration process.

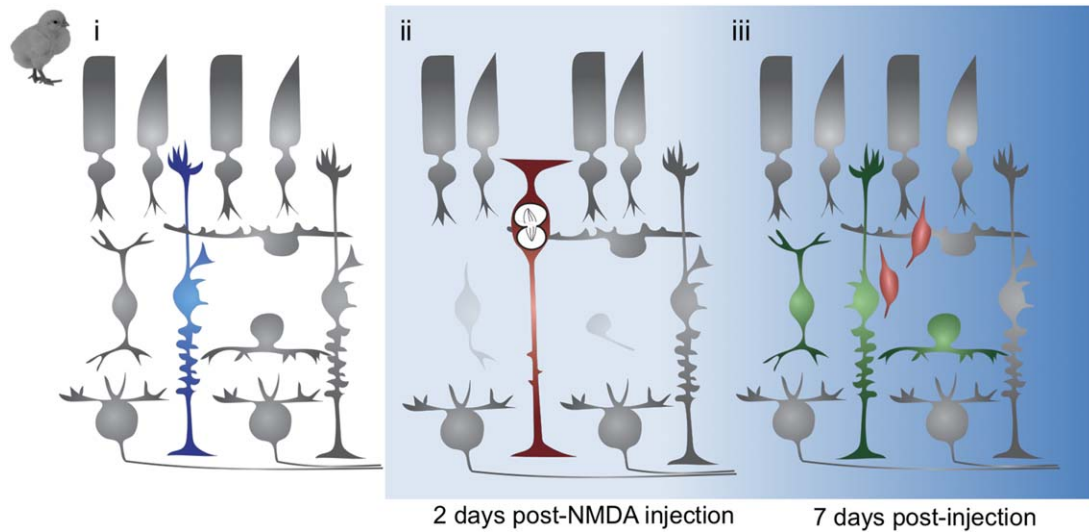
Triggering cell proliferation is a key event in regeneration but the cessation of cell division is just as important to prevent uncontrolled progenitor cell expansion. In addition to its roles

mentioned above, *Insm1* also promotes progenitor cell-cycle exit in the regenerative retina by stimulating expression of the cyclin-cdk inhibitor, p57kip2 (Ramachandran et al., 2012).

### Müller Cell Response to Injury in Amphibians

Urodele amphibians, such as the newt or the salamander, have the fascinating capacity to regenerate organs, including the retina, following ablation (Mitashov, 1996). Anuran amphibians are less renowned in the field as their regenerative ability was thought to be restricted to the larval stages and disappear after metamorphosis (Hitchcock et al., 2004). However, it was demonstrated in 2007 that the frog *Xenopus* actually retains the





**Fig. 4.** Müller cell response to NMDA-induced retinal damage in the chick. **i:** In the chick, as in zebrafish (see Fig. 2), a subset of Müller cells (in blue) have the potential to re-enter the cell cycle upon retinal injury. **ii:** Acute retinal damage induced by NMDA treatment leads to amacrine and bipolar cell apoptosis (light grey) and subsequent dedifferentiation and proliferation of some Müller cells (in red). Such injury-induced Müller cells undergo interkinetic nuclear migration with their nuclei moving toward the outer nuclear layer when entering M phase. **iii:** Proliferative Müller cells self-renew and generate amacrine and bipolar cells (in green). However, most of the newly formed cells remain as undifferentiated progenitor-like cells (in red).

capacity to regenerate its retina at postmetamorphic stages following retinectomy (Yoshii et al., 2007). Although contrasting modes of regeneration in different amphibian species have been documented, in all cases, RPE cells and/or retinal stem cells from the ciliary margin have been reported as the cellular sources of newly generated neurons (Vergara and Del Rio-Tsonis, 2009; Hidalgo et al., 2014; Miyake and Araki, 2014).

What about Müller cells? Under physiological conditions, they are quiescent in amphibians, unlike the adult fish situation where a subset of Müller glia is slowly cycling and constantly generating rod precursors. Although amphibians are famous for regeneration, it is still unknown whether their Müller cells participate in retinal repair. Because retinal regeneration was mostly studied following large ablation or even retinectomy, resident Müller cells response could not be investigated. However, the presence of some proliferating cells in the new retina after retinal detachment could be detected not only in the RPE and ciliary margin but also in Müller cells (Grigorian and Poplinskaia, 1999; Novikova et al., 2008). Such observation strongly suggests that Müller cells are able to re-enter the cell cycle upon damage. In accordance with this, retinal precursor cells were found at the wound site after partial retinal resection in premetamorphic *Xenopus laevis* (Martinez-De Luna et al., 2011). In contrast, conditional nitroreductase-mediated rod cell ablation was reported to trigger Müller cell hypertrophy but cell cycle re-entry was not observed (Choi et al., 2011). As in fish, such differences strongly suggest that Müller cell response in the amphibian retina may also differ according to the lesional paradigm, the extent of damage and/or the developmental stage of the animal (Vihtelic et al., 2005; Ng et al., 2014). We have recently established two injury models in *Xenopus* premetamorphic tadpoles: mechanical retinal injury and nitroreductase-mediated photoreceptor cell ablation. We found in both models that a subset of Müller cells do indeed re-enter the cell cycle (Perron lab, unpublished data). Therefore, it should henceforth be possible to elucidate whether these activated *Xenopus* Müller glia divide asymmetrically and self-renew, whether

their progeny differentiate into new neurons, whether such reactivation also holds true in the adult, and whether this might be generalized to other amphibian species such as urodeles. By consequence, such novel amphibian models with targeted and limited retinal injury, instead of large ablations, are likely to provide an opportunity to explore the underlying molecular mechanisms of Müller cell-dependent retinal regeneration in vertebrates.

## Müller Cell Response to Injury in Birds

### Müller Cells Are Involved in Retinal Regeneration

The chick retina was thought to be incapable of regeneration after embryonic stages of development (Reh and Pittack, 1995). This was re-evaluated when a neurogenic region similar to the fish and amphibian ciliary margin was discovered in 2000 in the posthatched chick retina (Fischer and Reh, 2000). However, unlike the fish or amphibian CMZ, this area does not contribute to regeneration after retinal injury even when stimulated by exogenous growth factors (reviewed in Fischer, 2005; Fischer et al., 2013). Nevertheless, the regeneration of some types of retinal neurons has been reported in the posthatched chicken following acute neurotoxic damage, with a proliferative response observed in the central retina. These proliferative cells were identified as Müller cells (Fischer and Reh, 2002). For the first time, posthatched chicken Müller glial cells were thus shown to be capable of re-entering the cell cycle, dedifferentiating into retinal progenitors and generating new retinal neurons and Müller cells (Fig. 4). These injury-induced Müller cells generate different classes of neurons according to the types of cells that have been destroyed. For instance, amacrine and bipolar neurons are produced following their destruction by the neurotoxin N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) while ganglion cells can be generated when these cells are ablated by injections of colchicine or kainic acid (Fischer and Reh, 2002). So far, given the limited number of rod or cone degenerative models, it has been difficult to assess

whether photoreceptors are able to regenerate from Müller cells in the chicken retina. In a model of retinal detachment, Müller cells re-enter the cell cycle following photoreceptor loss but their ability to regenerate photoreceptors still remains an open question (Cebulla et al., 2012).

### Extrinsic Signals Triggering Müller Cell Activation

In the injured chicken retina, some signals triggering Müller cell response and their cellular sources have been recently identified. Dying neurons themselves may produce factors that elicit Müller cell regenerative response. Other potential sources of diffusible molecules, such as microglia or infiltrating macrophages, have also raised interest. Unlike in fish, the phagocytic ability of chicken Müller glia has not been demonstrated yet. On the other hand, microglia and macrophages become activated and function as phagocytes for the clearance of dying retinal cells following injury (Fischer et al., 2014). A recent study revealed that their activation also stimulates Müller cell dedifferentiation and cell cycle re-entry (Fischer et al., 2014). Although signals mediating these effects remain to be identified, they may include components of the complement system and pro-inflammatory cytokines (Fischer et al., 2014).

Additional extrinsic signals triggering Müller cell activation may also originate from an atypical glial cell type identified in the avian retina and named the nonastrocytic inner retinal glial cells (NIRG) (Fischer et al., 2010). Indeed, acute retinal damage causes their accumulation, migration and reactivity. NIRG cell behavior is actually linked to that of microglia (Zelinka et al., 2012). Both cell types could thus act in concert to communicate with Müller cells to initiate their cellular response following injury.

The inflammatory response of Müller cells may also influence their own reprogramming efficiency (Gallina et al., 2014b). Glucocorticoid receptors, usually associated with anti-inflammatory effects, were shown to have an inhibitory influence on Müller glia reactivation. These receptors are expressed by Müller cells and are dynamically regulated upon retinal damage, showing an initial decrease followed by a subsequent increase. The transient drop of glucocorticoid receptor signaling just after the injury may permit the formation of proliferating Müller glia (Gallina et al., 2014b).

The response of Müller glia to retinal damage is also most likely dependent on changes in the levels of secreted growth factors. This is supported by the fact that some combinations of exogenous growth factors, such as insulin and FGF2, synergistically stimulate Müller cell dedifferentiation and proliferation (Fischer and Reh, 2002; Fischer et al., 2002). It has been proposed that FGF2, through MAPK-signaling, exerts its effect directly on Müller glia to promote their dedifferentiation while Insulin would act in an indirect manner, affecting microglia and NIRG cell reactivity, which in turn would stimulate Müller cell proliferation (Fischer et al., 2009a,b; Fischer et al., 2010; Gallina et al., 2014a).

Although the Notch pathway is essential for maintaining Müller cell quiescence in zebrafish (see above), different conclusions were drawn from studies in the avian retina. As in the fish, Notch pathway components are up-regulated in chicken Müller glia after retinal damage. However, such Notch signaling activation appears necessary for the dedifferentiation and proliferation of Müller glia (Hayes et al., 2007; Ghai et al., 2010). This apparent disparity observed between the two species may contribute to

their different regenerative potentials or may reflect the complex and dynamic role of Notch signaling during regeneration in different cell types, i.e. quiescent Müller cells, dedifferentiated Müller cells or progenitor cells. Indeed, a biphasic role of Notch was uncovered during chicken retinal regeneration: although Notch activation is necessary for the initial steps of the regeneration, it is detrimental to successful completion of the process (Hayes et al., 2007).

Finally, recent work also demonstrated the involvement of Hedgehog signaling in Müller glia cell cycle re-entry (Todd and Fischer, 2015). The proposed model is that retinal injury triggers the release of Hedgehog from retinal ganglion cells rendering Müller cells receptive to the ligand. Subsequent activation of Hedgehog signaling then stimulates the dedifferentiation and proliferation of Müller cells.

The aforementioned pathways, FGF2/MAPK, Notch, and Hedgehog, likely function in a signaling network with multiple crosstalks to modulate the formation of reactive Müller glia upon injury. For instance, FGF2 was shown to activate components of the Notch-pathway (Ghai et al., 2010) and to render Müller glia responsive to Hedgehog-signaling (Todd and Fischer, 2015), while the Notch pathway was reported to function downstream of Hedgehog signaling (Todd and Fischer, 2015).

## Müller Cell Response to Injury in Mammals

### Müller Cells Have a Neurogenic Potential

In contrast to the above species, the mammalian retina is not able to self-repair. Thus, human retinal diseases triggering neuronal cell death lead to permanent visual disorders. Nonetheless, several cell types in different regions of the adult mammalian retina can exhibit some degree of neurogenic potential under pathological circumstances. These include cells of the ciliary margin, RPE and Müller glial cells (Kiyama et al., 2012; Salero et al., 2012; Wang and Yan, 2014; Jayakody et al., 2015). Müller cells are quiescent in the adult healthy mammalian retina but have long been known to be reactive in disease or following injury. In such pathological situations, they undergo reactive gliosis, which includes changes in morphology, up-regulation of various markers, dedifferentiation, nuclear migration to the apical surface, and in some cases, proliferation (Dyer and Cepko, 2000; Bringmann et al., 2009). This process thus exhibits striking similarities with the early stages of the regenerative process observed in the fish or chick retina. However, given the lack of spontaneous neuron replacement in diseased eyes, it was believed that mammalian Müller cells could only undergo reactive gliosis and not neurogenesis. This view was challenged in 2004, when some Müller glia cells were shown to be able to dedifferentiate, re-enter the cell cycle, and produce new bipolar cells and rod photoreceptors, in response to NMDA-induced excitotoxic retinal damage (Ooto et al., 2004). Regeneration of photoreceptors from rodent Müller glia has subsequently been reported in models of photoreceptor degeneration: following N-methyl-N-nitrosourea (MNU) administration (Wan et al., 2008) or in retinal explants (Osakada et al., 2007). However, this Müller cell potential remains controversial as other teams found no dedifferentiation nor proliferation following NMDA-induced damage (Kugler et al., 2015). Similarly, photoreceptor damage due to intense light exposure does not seem to promote Müller cell proliferation (Joly et al., 2011). The authors suggest that the few cells that incorporate

bromodeoxyuridine are actually cells with on-going DNA repair rather than proliferative cells. Nevertheless, it was demonstrated that NMDA-induced damage coupled with growth factor treatment (see below) provides rodent Müller cells with the ability to proliferate and regenerate amacrine cells (Karl et al., 2008). Although the number of newly produced neurons remains quite small in rodent models, these studies unveiled the regenerative potential of the adult mammalian retina, which could be stimulated for therapeutic retinal repair purposes.

In vitro studies revealed that rodent and human Müller cells in culture can generate both glial cells and neurons (Das et al., 2006; Lawrence et al., 2007; Zhao et al., 2014b). Of interest, human Müller glial cells in culture differentiate toward rods four to six times faster than conventional differentiating pluripotent stem cells (Giannelli et al., 2011). When transplanted into a photoreceptor or ganglion cell depleted retina, these Müller cell-derived neurons migrate, integrate into the appropriate retinal layer and lead to improvement in rod or ganglion cell function, respectively (Singhal et al., 2012; Jayaram et al., 2014).

As mentioned above, a recent study suggested that a subset of Müller cells in the mouse retina may derive from the neural crest (Liu et al., 2014). This is quite surprising and contrasts with results of most neural crest lineage tracing studies and with previous evidence that Müller glia is exclusively derived from the retinal neuroepithelium. Nevertheless, the authors raised the intriguing possibility that the regenerative capacity of only a subpopulation of Müller glia may be associated with their neural crest origin. If this is indeed the case, there are many issues that could be addressed in the future such as whether or not the proportion of neural crest-derived Müller cells differs in the retina of different species, and whether this could underlie their contrasting regenerative abilities.

### Müller Cell Reprogramming

The in vivo study of mammalian Müller cell regenerative response to injury has been challenging given their very limited and inefficient capacity for retinal repair. A recent detailed analysis of Müller cell behavior was reported ex vivo in mouse retinal explants, a system where neuronal loss spontaneously occurs (Löffler et al., 2015). In these explants, Müller glia present different states that recapitulate the major phases described in regenerating fish and chick Müller cells: from a quiescent state, they dedifferentiate/reprogram, proliferate and then generate neuronal progenies, in particular amacrine neurons. Under appropriate growth factors stimulation (see the paragraph below on extrinsic signals triggering Müller cell activation), more than half of the Müller cells can re-enter the cell cycle (Löffler et al., 2015).

Regarding the molecular mechanisms underlying mammalian Müller cell reprogramming, ASCL1 was a potential candidate, given its key role in the conversion of fish Müller cells into retinal progenitor cells. Of interest, *Ascl1* is not up-regulated in the mouse retina after NMDA-induced damage (Karl et al., 2008), which could account for the limited regenerative capacity of mammalian Müller cells. On the other hand, using the mouse retina organ culture approach, it was shown that *Ascl1* is up-regulated following retinal damage in a subset of Müller glia in young mice (Löffler et al., 2015). Of interest, this differential expression according to the age of the animal correlates with the higher potential for Müller cells to reprogram in young mice than in old mice (Ueki et al., 2012; Löffler et al., 2015). Moreover, it

was shown that ASCL1 overexpression is sufficient to reprogram mouse Müller cells in vitro and activate a neurogenic program (Pollak et al., 2013). More recently, this issue was addressed in vivo in adult Müller glia (Ueki et al., 2015). Although *Ascl1* overexpression in undamaged retina does not affect Müller cell behavior, it promotes their cell cycle re-entry and neurogenic potential when the retina is injured. Again, this Müller cell response is even more pronounced in young mice. Together, this supports the hypothesis that a deficit in *Ascl1* up-regulation in adult Müller cells might restrict their ability to reprogram. Thus, a potential difference between mammalian and fish Müller glia underlying their difference in regenerative potential is their unique levels of the transcription factor ASCL1 (Ueki et al., 2015). *Ascl1* overexpression-dependent reprogramming involves chromatin remodelling of ASCL1 targets from a repressive to an active configuration (Pollak et al., 2013). Of interest, some chromatin remodelling factors were shown to be differentially expressed in two mouse strains exhibiting different degrees of Müller cell proliferation upon damage (Suga et al., 2014). Further experiments are needed to provide a deeper understanding of epigenetic regulation in Müller cell reprogramming.

As discussed above, the promoters of pluripotency factors, including that of *Ascl1*, are hypomethylated in quiescent zebrafish Müller cells (Powell et al., 2013). Unexpectedly, these promoters also exhibit permissive methylation levels in mammals. This suggests that, as their zebrafish counterparts, mouse Müller cells may be poised for reprogramming in case of injury (Powell et al., 2013). Therefore, it seems that methylation status of pluripotency genes is not a limiting factor that could explain the ineffective regenerative capacity of Müller cells in mammals compared with fish.

### Extrinsic Signals Triggering Müller Cell Activation

The identification of factors that could be used to recruit Müller cells and stimulate their regenerative potential is obviously subject of intense interest. For instance, the release of glutamate from dying neurons may serve as a signal to activate Müller glia. Indeed, it has been shown that subtoxic levels of glutamate are sufficient to directly stimulate Müller glia to re-enter the cell cycle and induce neurogenesis (Takeda et al., 2008).

As in nonmammalian species, the proliferation of rodent Müller cells can be greatly stimulated by exogenous growth factors, such as FGF, EGF, or insulin (Ooto et al., 2004; Close et al., 2006; Karl et al., 2008; Fischer and Bongini, 2010). However, the action of these factors and the involved downstream genetic cascades remain poorly understood. Recent evidence has revealed that activation of both MEK/ERK1/2 and PI3K/AKT pathways is required for Müller glia to proliferate in response to EGF (Ueki and Reh, 2013). Bone morphogenetic protein (BMP) signaling is also activated by the EGF pathway, downstream of PI3K/AKT activation, and is essential for Müller glia proliferation (Ueki and Reh, 2013).

Several studies demonstrated that the proliferative and neurogenic properties of mammalian Müller cells following injury can also be stimulated by key signaling pathways, such as Wnt (Das et al., 2006; Osakada et al., 2007; del Debbio et al., 2010; Liu et al., 2013), Notch (Das et al., 2006; del Debbio et al., 2010), and Hedgehog (Wan et al., 2007). How these pathways relate to one another in reactive murine Müller cells remains to be investigated.

## Maintenance of Müller Cell Quiescence

The limited proliferative response to injury of Müller glia in mammals compared with nonmammalian species may be due to limited pro-mitogenic factors and/or inhibitory mechanisms. Consequently, the identification of molecular cues limiting mammalian Müller cell proliferation may provide hints to unlock their latent regenerative capacity. For instance, p53 has recently been identified as a factor restricting Müller glia potential for retinal regeneration (Ueki et al., 2012; Zhao et al., 2014b). TGF $\beta$  signaling, which stimulates the expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup>, is essential for the establishment and the maintenance of the mitotic quiescence of rodent Müller cells at post-natal stages (Close et al., 2005). Whether TGF $\beta$  also has cytostatic effects in the damaged retina and could counterbalance mitogenic factor activity was a tempting hypothesis. However, a recent report showed that moderate modulation of TGF $\beta$  signaling was not sufficient to influence Müller glia cell proliferation following NMDA excitotoxic damage (Kugler et al., 2015). Yet, the consequences of the complete inhibition of TGF $\beta$  signaling in Müller cells remains to be investigated to fully exclude the involvement of this pathway in the maintenance of their quiescence. As mentioned above, the BMP pathway is activated in mammalian reactive Müller glia. Given the known gliogenic function of BMP, the question is raised as to whether it could thus interfere with the neurogenic potential of mammalian Müller cells (Ueki and Reh, 2013).

Finally, the ability to regenerate may be linked to changes in the immune response across evolution. Indeed, regenerative capacity is inversely correlated with the maturation of the immune system (Mescher and Neff, 2005; Godwin and Brockes, 2006; Godwin and Rosenthal, 2014). Of interest, it has recently been shown in the early embryonic chick, at a stage that precedes the appearance of Müller glia, that the complement fragment C3a is sufficient to induce complete retinal regeneration from the ciliary margin (Haynes et al., 2013). Whether or not this effect is mediated through an innate cellular immune response remains to be addressed. Further studies are needed to elucidate the relationship between immune mechanisms and the regenerative capacity of Müller cells in mammalian retinal regeneration.

## Conclusions and Future Prospects

Much interest has been generated lately by the stemness potential of Müller glial cells. Whether they should be considered as stem cells is a matter of debate, as they do not function as such in the noninjured retina. Nonetheless, in response to neuronal loss, Müller cells can exhibit stem-like properties as they can undergo a reprogramming process to re-acquire a progenitor state, self-renew, and generate new neurons. This offers much hope for treatments aimed at invigorating Müller glia-dependent retinal regeneration in mammals. Consequently, and as summarized in this review, discovering the cellular events and molecular mechanisms underlying Müller cell behavior in species with different regenerative capacities is an active area of investigation. Although a wealth of data has been accumulated this past decade, it is a nascent field and there is still a long way to go.

To obtain further insights into the signaling network underlying the different steps of Müller cell-dependent regeneration, many key questions remain to be addressed. Why does only a subset of Müller cells respond to retinal injury? Are there distinct

subpopulations endowed with different regenerative capabilities? Molecular fingerprint indeed suggested some heterogeneity within Müller glial cells (Roesch et al., 2008). Why is the Müller cell-dependent regeneration so constrained in mammals compared with other species? Are there extrinsic inhibitors, intrinsic differences, epigenetic constraints, and halting immune mechanisms? Answering those questions should contribute to the design of therapeutic strategies to enhance Müller cell potential in patients afflicted with degenerative diseases. Such regenerative therapy from endogenous Müller glia is very appealing. Indeed, although clinical trials based on transplantation of retinal cells derived from embryonic stem cells or iPS cells are underway and offer tremendous hope to patients suffering from presently untreatable retinal diseases, substantial challenges still lie ahead (Wright et al., 2014). For instance, the process to produce retinal cells in vitro is costly, time-consuming and complex, the surgical procedure is delicate, there may be residual pluripotent stem cells with a tumorigenic potential within donor cells, the integration into the existing neural network is extremely challenging, and there may be immune rejection and potential ethical objections. On the other hand, unlocking mammalian Müller glia regenerative potential would circumvent all the issues related to the in vitro cell derivation and transplantation procedures. Moreover, Müller cells seem to lack any tumorigenic potential (Giannelli et al., 2011). Therefore, the stemness potential of Müller cells warrants intensive investigations not only to increase our knowledge of the fascinating regenerative process but also for potential medical applications.

## Acknowledgments

The authors thank Megan Barnes, Juliette Bitard, and Morgane Locker for their comments on this review. M.P.'s laboratory is supported by grants from the ANR, Idex Paris-Saclay, Retina France, FRM. Research in X-J.Y.'s laboratory has been supported by NIH/NEI core grant and Research to Prevent Blindness unrestricted grant to UCLA Stein Eye Institute, and by the Ernest G. Herman endowed Professorship of Ophthalmology.

## References

- Ahmad I, del Debbio CB, Das AV, Parameswaran S. 2011. Müller glia: a promising target for therapeutic regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:5758–5764.
- Bailey TJ, Fossum SL, Fimbel SM, Montgomery JE, Hyde DR. 2010. The inhibitor of phagocytosis, O-phospho-L-serine, suppresses Müller glia proliferation and cone cell regeneration in the light-damaged zebrafish retina. *Exp Eye Res* 9:1–14.
- Belecky-Adams TL, Chernoff EC, Wilson JM, Dharmarajan S. 2013. Reactive Müller glia as potential retinal progenitors. In: *Neural stem cells - new perspectives*. Luca Bonfanti, Editor; ISBN: 978-953-51-1069-9, InTech. p 73–117.
- Bernardos RL, Barthel LK, Meyers JR, Raymond PA. 2007. Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27:7028–7040.
- Blackshaw S, Harpavat S, Trimarchi J, Cai L, Huang H, Kuo WP, Weber G, Lee K, Fraioli RE, Cho SH, Yung R, Asch E, Ohno-Machado L, Wong WH, Cepko CL. 2004. Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol* 2:1411–1431.
- Braisted JE, Essman TF, Raymond PA. 1994. Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina. *Development* 120:2409–2419.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25:397–424.

- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. 2009. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects. *Prog Retin Eye Res* 28:423–451.
- Brockerhoff SE, Fadool JM. 2011. Genetics of photoreceptor degeneration and regeneration in zebrafish. *Cell Mol Life Sci* 68: 651–659.
- Cebulla CM, Zelinka CP, Scott MA, Lubow M, Bingham A, Rasiyah S, Mahmoud AM, Fischer AJ. 2012. A chick model of retinal detachment: cone rich and novel. *PLoS One* 7:e44257.
- Centanin L, Hoeckendorf B, Wittbrodt J. 2011. Fate restriction and multipotency in retinal stem cells. *Cell Stem Cell* 9:553–562.
- Choi RY, Engbretson GA, Solessio EC, Jones GA, Coughlin A, Aleksic I, Zuber ME. 2011. Cone degeneration following rod ablation in a reversible model of retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:364–373.
- Close JL, Gumuscu B, Reh TA. 2005. Retinal neurons regulate proliferation of postnatal progenitors and Müller glia in the rat retina via TGF beta signaling. *Development* 132:3015–3026.
- Close JL, Liu J, Gumuscu B, Reh TA. 2006. Epidermal growth factor receptor expression regulates proliferation in the postnatal rat retina. *Glia* 54:94–104.
- Conner C, Ackerman KM, Lahne M, Hobgood JS, Hyde DR. 2014. Repressing Notch signaling and expressing TNF are sufficient to mimic retinal regeneration by inducing Müller glial proliferation to generate committed progenitor cells. *J Neurosci* 34:14403–14419.
- Das AV, Mallya KB, Zhao X, Ahmad F, Bhattacharya S, Thoreson WB, Hegde GV, Ahmad I. 2006. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 299:283–302.
- del Debbio CB, Balasubramanian S, Parameswaran S, Chaudhuri A, Qiu F, Ahmad I. 2010. Notch and wnt signaling mediated rod photoreceptor regeneration by Müller cells in adult mammalian retina. *PLoS One* 5:e12425.
- Dyer MA, Cepko CL. 2000. Control of Müller glial cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat Neurosci* 3:873–880.
- Egensperger R, Maslim J, Bisti S, Holländer H, Stone J. 1996. Fate of DNA from retinal cells dying during development: uptake by microglia and macroglia (Müller cells). *Brain Res Dev Brain Res* 97:1–8.
- Fausett BV, Goldman D. 2006. A role for alpha1 tubulin-expressing Müller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci* 26:6303–6313.
- Fausett BV, Gumerson JD, Goldman D. 2008. The proneural basic helix-loop-helix gene *ascl1a* is required for retina regeneration. *J Neurosci* 28:1109–1117.
- Fimbel SM, Montgomery JE, Burket CT, Hyde DR. 2007. Regeneration of inner retinal neurons after intravitreal injection of ouabain in zebrafish. *J Neurosci* 27:1712–1724.
- Fischer AJ. 2005. Neural regeneration in the chick retina. *Prog Retin Eye Res* 24:161–182.
- Fischer AJ, Bongini R. 2010. Turning Müller glia into neural progenitors in the retina. *Mol Neurobiol* 42:199–209.
- Fischer AJ, Reh TA. 2000. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol* 220: 197–210.
- Fischer AJ, Reh TA. 2001. Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 4: 247–252.
- Fischer AJ, Reh TA. 2002. Exogenous growth factors stimulate the regeneration of ganglion cells in the chicken retina. *Dev Biol* 251: 367–379.
- Fischer AJ, McGuire CR, Dierks BD, Reh TA. 2002. Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *J Neurosci* 22:9387–9398.
- Fischer AJ, Scott MA, Ritchey ER, Sherwood P. 2009a. Mitogen-activated protein kinase-signaling regulates the ability of Müller glia to proliferate and protect retinal neurons against excitotoxicity. *Glia* 57:1538–1552.
- Fischer AJ, Scott MA, Tuten W. 2009b. Mitogen-activated protein kinase-signaling stimulates Müller glia to proliferate in acutely damaged chicken retina. *Glia* 57:166–181.
- Fischer AJ, Scott MA, Zelinka C, Sherwood P. 2010. A novel type of glial cell in the retina is stimulated by insulin-like growth factor 1 and may exacerbate damage to neurons and Müller glia. *Glia* 58:633–649.
- Fischer AJ, Bosse JL, El-Hodiri HM. 2013. The ciliary marginal zone (CMZ) in development and regeneration of the vertebrate eye. *Exp Eye Res* 116:199–204.
- Fischer AJ, Zelinka C, Gallina D, Scott MA, Todd L. 2014. Reactive microglia and macrophage facilitate the formation of Müller glia-derived retinal progenitors. *Glia* 62:1608–1628.
- Gallina D, Todd L, Fischer AJ. 2014a. A comparative analysis of Müller glia-mediated regeneration in the vertebrate retina. *Exp Eye Res* 123:121–130.
- Gallina D, Zelinka C, Fischer AJ. 2014b. Glucocorticoid receptors in the retina, Müller glia and the formation of Müller glia-derived progenitors. *Development* 3340–3351.
- Gemberling M, Bailey TJ, Hyde DR, Poss KD. 2013. The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet* 29: 611–620.
- Ghai K, Zelinka C, Fischer AJ. 2010. Notch signaling influences neuroprotective and proliferative properties of mature Müller glia. *J Neurosci* 30:3101–3112.
- Giannelli SG, Demontis GC, Pertile G, Rama P, Broccoli V. 2011. Adult human Müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors. *Stem Cells* 29:344–356.
- Godwin JW, Brookes J P. 2006. Regeneration, tissue injury and the immune response. *J Anat* 209:423–432.
- Godwin JW, Rosenthal N. 2014. Scar-free wound healing and regeneration in amphibians: immunological influences on regenerative success. *Differentiation* 87:66–75.
- Goldman D. 2014. Müller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci* 15:431–442.
- Gorsuch RA, Hyde DR. 2014. Regulation of Müller glial dependent neuronal regeneration in the damaged adult zebrafish retina. *Exp Eye Res* 123:131–140.
- Grigorian EN, Poplinskaia VA. 1999. [Discovery of internal sources of the neural retinal regeneration after its detachment in Pleurodeles. II. The radioautography study]. *Izv Akad Nauk Ser Biol* 583–591.
- Hayes S, Nelson BR, Buckingham B, Reh TA. 2007. Notch signaling regulates regeneration in the avian retina. *Dev Biol* 312:300–311.
- Haynes T, Luz-Madrigal A, Reis ES, Echeverri Ruiz NP, Grajales-Esquivel E, Tzekou A, Tsonis PA, Lambris JD, Del Rio-Tsonis K. 2013. Complement anaphylatoxin C3a is a potent inducer of embryonic chick retina regeneration. *Nat Commun* 4:2312.
- Hidalgo M, Locker M, Chesneau A, Perron M. 2014. Stem cells and regeneration in the *Xenopus* retina. In: Pébay A, editor. *Regenerative biology of the eye, stem cell biology and regenerative medicine*. New York, NY: Springer New York. p 83–99.
- Hitchcock PF, Lyndsey Myhr KJ, Easter SS, Mangione-Smith R, Jones DD. 1992. Local regeneration in the retina of the goldfish. *J Neurobiol* 23:187–203.
- Hitchcock P, Ochocinska M, Sieh A, Otterson D. 2004. Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 23:183–194.
- Holt E, Bertsch W, Harris A. 1988. Cellular determination in the *Xenopus* retina is independent of lineage and birth date division. *Neuron* 1:15–26.
- Jadhav AP, Roesch K, Cepko CL. 2009. Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 28:249–262.
- Jayakody SA, Gonzalez-Cordero A, Ali RR, Pearson RA. 2015. Cellular strategies for retinal repair by photoreceptor replacement. *Prog Retin Eye Res* 46:31–66.
- Jayaram H, Jones MF, Eastlake K, Cottrill PB, Becker S, Wiseman J, Khaw PT, Limb GA. 2014. Transplantation of photoreceptors derived from human Müller glia restore rod function in the P23H rat. *Stem Cells Transl Med* 3:323–333.
- Jeon C, Strettoi E, Masland RH. 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18:8936–8946.
- Johns PR. 1977. Growth of the adult goldfish eye-I: optics. *J Comp Neurol* 176:343–358.

- Johns PR. 1982. Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *J Neurosci* 2:178–98.
- Johns PR, Fernald RD. 1981. Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature* 293:141–142.
- Joly S, Pernet V, Samardzija M, Grimm C. 2011. PAX6-positive Müller glia cells express cell cycle markers but do not proliferate after photoreceptor injury in the mouse retina. *Glia* 59:1033–1046.
- Julian D, Ennis K, Korenbrot JI. 1998. Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J Comp Neurol* 394:271–282.
- Karl MO. 2013. The potential of stem cell research for the treatment of neuronal damage in glaucoma. *Cell Tissue Res* 353:311–325.
- Karl MO, Reh TA. 2010. Regenerative medicine for retinal diseases: activating endogenous repair mechanisms. *Trends Mol Med* 16:193–202.
- Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh TA. 2008. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19508–19513.
- Kassen SC. 2007. Time course analysis of gene expression during light-induced photoreceptor cell death and regeneration in albino zebrafish. *Dev Neurobiol* 67:1009–1031.
- Kassen SC, Thummel R, Campochiaro LA, Harding MJ, Bennett NA, Hyde DR. 2009. CNTF induces photoreceptor neuroprotection and Müller glial cell proliferation through two different signaling pathways in the adult zebrafish retina. *Exp Eye Res* 88:1051–1064.
- Kaylor JJ, Yuan Q, Cook J, Sarfare S, Makshanoff J, Miu A, Kim A, Kim P, Habib S, Roybal CN, Xu T, Nusinowitz S, Travis GH. 2013. Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Müller glial cells of the retina. *Nat Chem Biol* 9:30–36.
- Kaylor JJ, Cook JD, Makshanoff J, Bischoff N, Yong J, Travis GH. 2014. Identification of the 11-cis-specific retinyl-ester synthase in retinal Müller cells as multifunctional O-acyltransferase (MFAT). *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:7302–7307.
- Kiyama T, Li H, Gupta M, Lin Y-P, Chuang AZ, Otteson DC, Wang SW. 2012. Distinct neurogenic potential in the retinal margin and the pars plana of mammalian eye. *J Neurosci* 32:12797–12807.
- Krishnakumar R, Bleiloch RH. 2013. Epigenetics of cellular reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* 23:548–555.
- Kugler M, Schlecht A, Fuchshofer R, Kleiter I, Aigner L, Tamm ER, Braunger BM. 2015. Heterozygous modulation of TGF- $\beta$  signaling does not influence Müller glia cell reactivity or proliferation following NMDA-induced damage. *Histochem Cell Biol* 144:443–455.
- Lahne M, Marton R, Hyde D. 2013. The role of rocks during interkinetic nuclear migration in the regenerating adult zebrafish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:1164.
- Lamba D, Karl M, Reh T. 2008. Neural regeneration and cell replacement: a view from the eye. *Cell Stem Cell* 2:538–549.
- Lamba DA, Karl MO, Reh TA. 2009. Strategies for retinal repair: cell replacement and regeneration. *Prog Brain Res* 175:23–31.
- Lawrence JM, Singhal S, Bhatia B, Keegan DJ, Reh TA, Luthert PJ, Khaw PT, Limb GA. 2007. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells* 25:2033–2043.
- Lenkowski JR, Raymond PA. 2014. Müller glia: stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog Retin Eye Res* 40:94–123.
- Lenkowski JR, Qin Z, Sifuentes CJ, Thummel R, Soto CM, Moens CB, Raymond PA. 2013. Retinal regeneration in adult zebrafish requires regulation of TGF $\beta$  signaling. *Glia* 61:1687–97.
- Liu B, Hunter DJ, Rooker S, Chan A, Paulus YM, Leucht P, Nusse Y, Nomoto H, Helms JA. 2013. Wnt signaling promotes Müller cell proliferation and survival after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:444–453.
- Liu B, Hunter DJ, Smith AA, Chen S, Helms JA. 2014. The capacity of neural crest-derived stem cells for ocular repair. *Birth Defects Res C Embryo Today Rev* 102:299–308.
- Livesey FJ, Cepko CL. 2001. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2:109–118.
- Livesey FJ, Young TL, Cepko CL. 2004. An analysis of the gene expression program of mammalian neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1374–1379.
- Löffler K, Schäfer P, Völkner M, Holdt T, Karl MO. 2015. Age-dependent Müller glia neurogenic competence in the mouse retina. *Glia* 63:1809–1824.
- Lombardo F. 1968. La rigenerazione della retina negli adulti di un Teleosteo (Regeneration of the retina in an adult teleost). *Accad Lincei-Rend Sci Fis Mat Nat Ser* 8:631–635.
- Maier W, Wolburg H. 1979. Regeneration of the goldfish retina after exposure to different doses of ouabain. *Cell Tissue Res* 202:99–118.
- Martinez-De Luna RI, Kelly LE, El-Hodiri HM. 2011. The Retinal Homeobox (Rx) gene is necessary for retinal regeneration. *Dev Biol* 353:10–18.
- Mescher AL, Neff AW. 2005. Regenerative capacity and the developing immune system. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 93:39–66.
- Meyers JR, Hu L, Moses A, Kaboli K, Papandrea A, Raymond PA. 2012.  $\beta$ -catenin/Wnt signaling controls progenitor fate in the developing and regenerating zebrafish retina. *Neural Dev* 7:30.
- Mitashov VI. 1996. Mechanisms of retina regeneration in urodeles. *Int J Dev Biol* 40:833–844.
- 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. *Dev Neurobiol* 74:739–756.
- Morris AC, Schroeter EH, Bilotta J, Wong ROL, Fadool JM. 2005. Cone survival despite rod degeneration in XOPS-mCFP transgenic zebrafish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:4762–4771.
- Moshiri A, Close J, Reh TA. 2004. Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol* 48:1003–1014.
- Müller H. 1851. Zur Histologie der Netzhaut. *Zeitschrift für Wiss Zool* 3:234–237.
- Nagashima M, Barthel LK, Raymond PA. 2013. A self-renewing division of zebrafish Müller glial cells generates neuronal progenitors that require N-cadherin to regenerate retinal neurons. *Development* 140:4510–4521.
- Negishi K, Stell WK, Teranishi T, Karkhanis A, Owusu-Yaw V, Takasaki Y. 1991. Induction of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-immunoreactive cells in goldfish retina following intravitreal injection with 6-hydroxydopamine. *Cell Mol Neurobiol* 11:639–659.
- Nelson BR, Ueki Y, Reardon S, Karl MO, Georgi S, Hartman BH, Lamba DA, Reh TA. 2011. Genome-wide analysis of Müller glial differentiation reveals a requirement for Notch signaling in post-mitotic cells to maintain the glial fate. *PLoS One* 6:e22817.
- Nelson CM, Gorsuch RA, Bailey TJ, Ackerman KM, Kassen SC, Hyde DR. 2012. Stat3 defines three populations of Müller glia and is required for initiating maximal müller glia proliferation in the regenerating zebrafish retina. *J Comp Neurol* 520:4294–4311.
- Nelson CM, Ackerman KM, O'Hayer P, Bailey TJ, Gorsuch RA, Hyde DR. 2013. Tumor necrosis factor-alpha is produced by dying retinal neurons and is required for Müller glia proliferation during zebrafish retinal regeneration. *J Neurosci* 33:6524–6539.
- Ng J, Currie P, Jusuf P. 2014. The regenerative potential of the vertebrate retina: lessons from the Zebrafish. In: *Regenerative biology of the eye, stem cell biology and regenerative medicine*. Alice Pébay, editor. New York: Humana Press. p 49–82.
- Novikova IP, Poplinskaia VA, Aleïnikova KS, Grigorian EN. 2008. [A study of the localization and accumulation of S-phase cells in the retina of newt *Pleurodeles waltl* after experimental pigment epithelial detachment]. *Ontogenez* 39:143–150.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13654–13659.
- Osakada F, Ooto S, Akagi T, Mandai M, Akaike A, Takahashi M. 2007. Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. *J Neurosci* 27:4210–4219.
- Otteson DC, Hitchcock PF. 2003. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Res* 43:927–936.
- Otteson DC, D'Costa AR, Hitchcock PF. 2001. Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev Biol* 232:62–76.
- Perron M, Locker M, Bronchain O. 2012. Stem cells to repair retina: from basic to applied biology. In: *Stem cells and cancer stem cells*. M.A. Hayat, Editor. Springer Netherlands. Vol. 2. p 155–166.

- Pollak J, Wilken MS, Ueki Y, Cox KE, Sullivan JM, Taylor RJ, Levine EM, Reh TA. 2013. ASCL1 reprograms mouse Müller glia into neurogenic retinal progenitors. *Development* 140:2619–2631.
- Powell C, Grant AR, Cornblath E, Goldman D. 2013. Analysis of DNA methylation reveals a partial reprogramming of the Müller glia genome during retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:19814–19819.
- Qin Z, Raymond PA. 2012. Microarray-based gene profiling analysis of Müller glia-derived retinal stem cells in light-damaged retinas from adult zebrafish. *Methods Mol Biol* 884:255–261.
- Qin Z, Barthel LK, Raymond PA. 2009. Genetic evidence for shared mechanisms of epimorphic regeneration in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9310–9315.
- Ramachandran R, Fausett BV, Goldman D. 2010. Ascl1a regulates Müller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. *Nat Cell Biol* 12:1101–1107.
- Ramachandran R, Zhao X-F, Goldman D. 2011. Ascl1a/Dkk/ B-catenin signaling pathway is necessary and glycogen synthase kinase-3 inhibition is sufficient for zebrafish retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:15858–15863.
- Ramachandran R, Zhao X-F, Goldman D. 2012. Insm1a-mediated gene repression is essential for the formation and differentiation of Müller glia-derived progenitors in the injured retina. *Nat Cell Biol* 14:1013–1023.
- Raymond PA, Reifler MJ, Rivlin PK. 1988. Regeneration of goldfish retina: rod precursors are a likely source of regenerated cells. *J Neurobiol* 19:431–463.
- Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL, Perkowski JJ. 2006. Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol* 6:36.
- Reh TA, Pittack C. 1995. Transdifferentiation and retinal regeneration. *Semin Cell Biol* 6:137–142.
- Reichenbach A, Bringmann A. 2010. Müller cells in the healthy and diseased retina. New York: Springer Science & Business Media.
- Roesch K, Jadhav AP, Trimarchi JM, Stadler MB, Roska B, Sun BB, Cepko CL. 2008. The transcriptome of retinal Müller glial cells. *J Comp Neurol* 509:225–238.
- Salero E, Blenkinsop TA, Corneo B, Harris A, Rabin D, Stern JH, Temple S. 2012. Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives. *Cell Stem Cell* 10:88–95.
- Sherpa T, Lankford T, McGinn TE, Hunter SS, Frey RA, Sun C, Ryan M, Robison BD, Stenkamp DL. 2014. Retinal regeneration is facilitated by the presence of surviving neurons. *Dev Neurobiol* 74:851–876.
- Singhal S, Bhatia B, Jayaram H, Becker S, Jones MF, Cottrill PB, Khaw PT, Salt TE, Limb GA. 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 Transl Med* 1:188–199.
- Stenkamp DL. 2007. Neurogenesis in the fish retina. *Int Rev Cytol* 259:173–224.
- Stenkamp DL. 2011. The rod photoreceptor lineage of teleost fish. *Prog Retin Eye Res* 30:395–404.
- Strettoi E, Masland RH. 1995. The organization of the inner nuclear layer of the rabbit retina. *J Neurosci* 15:875–888.
- Suga A, Sadamoto K, Fujii M, Mandai M, Takahashi M. 2014. Proliferation potential of Müller glia after retinal damage varies between mouse strains. *PLoS One* 9:e94556.
- Takeda M, Takamiya A, Jiao J, Cho K, Simon G, Matsuda T, Chen DF. 2008. alpha-Aminoacidate induces progenitor cell properties of Müller glia in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:1142–1150.
- Thomas JL, Nelson CM, Luo X, Hyde DR, Thummel R. 2012. Characterization of multiple light damage paradigms reveals regional differences in photoreceptor loss. *Exp Eye Res* 97:105–116.
- Thomas JL, Ranski AH, Morgan GW, Thummel R. 2015. Reactive gliosis in the adult zebrafish retina. *Exp Eye Res* 143:98–109.
- Todd L, Fischer AJ. 2015. Hedgehog-signaling stimulates the formation of proliferating Müller glia-derived progenitor cells in the retina. *Development* 142:2610–2622.
- Turner DL, Cepko CL. 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328:131–136.
- Ueki Y, Reh TA. 2013. EGF stimulates Müller glial proliferation via a BMP-dependent mechanism. *Glia* 61:778–789.
- Ueki Y, Karl MO, Sudar S, Pollak J, Taylor RJ, Loeffler K, Wilken MS, Reardon S, Reh TA. 2012. P53 is required for the developmental restriction in Müller glial proliferation in mouse retina. *Glia* 60:1579–1589.
- Ueki Y, Wilken MS, Cox KE, Chipman L, Jorstad N, Sternhagen K, Simic M, Ullom K, Nakafuku M, Reh TA. 2015. Transgenic expression of the proneural transcription factor Ascl1 in Müller glia stimulates retinal regeneration in young mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:13717–13722.
- Vergara MN, Del Rio-Tsonis K. 2009. Retinal regeneration in the *Xenopus laevis* tadpole: a new model system. *Mol Vis* 15:1000–1013.
- Vihhtelic TS, Hyde DR. 2000. Light-induced rod and cone cell death and regeneration in the adult albino zebrafish (*Danio rerio*) retina. *J Neurobiol* 44:289–307.
- Vihhtelic TS, Soverly JE, Kassen SC, Hyde DR. 2005. Retinal regional differences in photoreceptor cell death and regeneration in light-lesioned albino zebrafish. *Exp Eye Res* 82:558–575.
- Vihhtelic TS, Soverly JE, Kassen SC, Hyde DR. 2006. Retinal regional differences in photoreceptor cell death and regeneration in light-lesioned albino zebrafish. *Exp Eye Res* 82:558–575.
- Wagner EC, Raymond PA. 1991. Müller glial cells of the goldfish retina are phagocytic in vitro but not in vivo. *Exp Eye Res* 53:583–589.
- 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. *Biochem Biophys Res Commun* 363:347–354.
- Wan J, Zheng H, Chen ZL, Xiao HL, Shen ZJ, Zhou GM. 2008. Preferential regeneration of photoreceptor from Müller glia after retinal degeneration in adult rat. *Vision Res* 48:223–234.
- Wan J, Ramachandran R, Goldman D. 2012. HB-EGF is necessary and sufficient for Müller glia dedifferentiation and retina regeneration. *Dev Cell* 22:334–347.
- Wan J, Zhao X-F, Vojtek A, Goldman D. 2014. Retinal injury, growth factors, and cytokines converge on  $\beta$ -catenin and pStat3 signaling to stimulate retina regeneration. *Cell Rep* 9:285–297.
- Wang S-Z, Yan R-T. 2014. The retinal pigment epithelium: a convenient source of new photoreceptor cells? *J Ophthalmic Vis Res* 9:83–93.
- West EL, Pearson RA, MacLaren RE, Sowden JC, Ali RR. 2009. Cell transplantation strategies for retinal repair. *Prog Brain Res* 175:3–21.
- Wetts R, Fraser SE. 1988. Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 239:1142–1145.
- Wright LS, Phillips MJ, Pinilla I, Hei D, Gamm DM. 2014. Induced pluripotent stem cells as custom therapeutics for retinal repair: progress and rationale. *Exp Eye Res* 123:161–172.
- Wu DM, Schneiderman T, Burgett J, Gokhale P, Barthel L, Raymond PA. 2001. Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2115–2124.
- 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.
- Yurco P, Cameron DA. 2005. Responses of Müller glia to retinal injury in adult zebrafish. *Vision Res* 45:991–1002.
- Zelinka CP, Scott MA, Volkov L, Fischer AJ. 2012. The reactivity, distribution and abundance of Non-astrocytic Inner Retinal Glial (NIRG) cells are regulated by microglia, acute damage, and IGF1. *PLoS One* 7:e44477.
- Zhao X-F, Wan J, Powell C, Ramachandran R, Myers MG, Goldman D. 2014a. Leptin and IL-6 family cytokines synergize to stimulate Müller glia reprogramming and retina regeneration. *Cell Rep* 9:272–284.
- Zhao JJ, Ouyang H, Luo J, Patel S, Xue Y, Quach J, Sfeir N, Zhang M, Fu X, Ding S, Chen S, Zhang K. 2014b. Induction of retinal progenitors and neurons from mammalian müller glia under defined conditions. *J Biol Chem* 289:11945–11951.





**Titre : Etude de la signalisation Hippo/YAP dans les cellules gliales de Müller en conditions physiologiques et pathologiques de dégénérescence rétinienne chez la souris**

**Mots clés:** Cellules gliales de Müller ; Régénération rétinienne ; Voie de signalisation Hippo/YAP ; Voie de signalisation EGFR ; Gliose réactive ; Prolifération cellulaire

**Résumé:** Les maladies dégénératives de la rétine sont une des causes principales de cécité. Parmi différentes stratégies thérapeutiques actuellement étudiées, notre équipe s'intéresse au potentiel régénératif de la rétine. Une source cellulaire d'intérêt sont les cellules de Müller, principal type de cellules gliales de la rétine, capables de se réactiver en cas de dégénérescence et d'adopter certaines caractéristiques de cellules souches. Elles entrent alors dans un état appelé gliose réactive. Tandis que chez certaines espèces comme le poisson, elles permettent la régénération de la rétine, elles ont des capacités régénératives très limitées et inefficaces chez les mammifères. Une meilleure connaissance des mécanismes moléculaires régissant la gliose réactive des cellules de Müller est donc essentielle si l'on veut identifier des cibles thérapeutiques capables de stimuler le potentiel de régénération de ces cellules. Dans ce contexte, le but de mon projet de thèse a été d'étudier le rôle du co-facteur de transcription YAP dans la réactivation des cellules de Müller. Cette protéine est l'effecteur de la voie de signalisation Hippo, connue pour son implication dans la régulation des cellules souches et la régénération de certains organes.

Dans un premier temps, nous avons réalisé une analyse transcriptomique qui a montré que la voie Hippo/YAP est une des principales voies dérégulées dans un modèle de dégénérescence rétinienne chez la souris. Nous avons ensuite montré que la protéine YAP est spécifiquement exprimée dans les cellules de Müller et que son expression et son activité transcriptionnelle sont augmentées au cours de la dégénérescence lorsque les cellules de Müller deviennent réactives. Ces données suggèrent pour la première fois un lien entre YAP et la gliose réactive dans la rétine. Par conséquent, dans un second temps, mon projet de thèse a consisté en l'étude fonctionnelle de YAP dans les cellules de Müller. Dans ce but, nous avons généré par croisements chez la souris un modèle inducible de délétion du gène *Yap* spécifiquement dans ces cellules. Ce modèle a permis de montrer qu'en absence de *Yap* en conditions physiologiques, plusieurs gènes spécifiques des cellules de Müller sont dérégulés, suggérant un dysfonctionnement de ces cellules. L'étude phénotypique a permis de révéler que ces dérégulations moléculaires conduisent à un vieillissement prématuré des cellules de Müller et à une baisse de la vision chez les souris âgées. Ces données suggèrent que YAP est requis pour le fonctionnement normal des cellules gliales de Müller. Nous avons ensuite examiné l'impact de la perte de *Yap* dans les cellules de Müller en conditions de dégénérescence des photorécepteurs. Une analyse transcriptomique a permis de montrer que différents aspects de la réponse moléculaire des cellules de Müller réactives sont affectés. Parmi les processus biologiques dérégulés, nous nous sommes intéressés à la régulation de la prolifération cellulaire. Nous avons montré que YAP est nécessaire à l'augmentation de l'expression de gènes associés à la réentrée dans le cycle cellulaire de la glie de Müller. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que des composants de la voie de signalisation EGFR, connue pour son rôle central dans la réactivation des cellules de Müller, sont régulés par YAP.

Dans l'ensemble, ces résultats révèlent l'importance de YAP (*i*) dans le fonctionnement des cellules de Müller en conditions physiologiques pour maintenir l'homéostasie rétinienne, et (*ii*) dans la régulation des processus de réactivation de ces cellules en conditions dégénératives. De plus, ces données permettent de proposer un modèle selon lequel YAP serait impliqué dans le contrôle de la réentrée des cellules de Müller dans le cycle cellulaire *via* une interaction avec la voie de signalisation EGFR. Ce travail a donc contribué à approfondir nos connaissances du réseau de signalisation impliqué dans la réactivation des cellules de Müller de la rétine des mammifères.

**Title : Study of Hippo/YAP signaling in Müller glial cells under physiological or pathological degenerative conditions in the mouse retina**

**Keywords:** Müller glial cells; Retinal regeneration; Hippo/YAP signaling pathway; EGFR signaling pathway; Reactive gliosis; Cell proliferation

**Abstract:** Retinal dystrophies are one of the main causes of blindness. Among the different therapeutic strategies currently studied, our team is interested in the regenerative potential of endogenous retinal cells. A cellular source of interest are Müller cells, which are the main type of glial cells in the retina. These cells are able to reactivate in case of retinal degeneration and adopt various characteristics of stem cells. They enter a state called reactive gliosis. While in some species such as the fish, they allow the complete regeneration of the retina, they have very limited and ineffective regenerative capacities in mammals. Increasing our knowledge of the complex molecular response of Müller cells to retinal degeneration is thus essential for the development of promising new therapeutic strategies. In this context, the aim of my thesis project was to study the role of the co-transcription factor YAP in Müller cells reactivation. This protein is the main effector of the Hippo signaling pathway which is a crucial player in the field of stem cell biology and regeneration.

As a first step, we performed a transcriptomic analysis, which revealed that the Hippo/YAP pathway is one of the main signaling deregulated in a mouse model of photoreceptor degeneration. In particular, we found that YAP is specifically expressed in Müller cells and strongly upregulated upon retinal degeneration, when these cells are reactivated. We thus uncovered for the first time a link between the Hippo/YAP pathway and reactive gliosis in the retina. Consequently, the second part of my thesis project was to undertake a functional study of YAP in Müller cells. For this purpose, we generated, by crossing, a mouse model allowing for *Yap* conditional knockout specifically in these cells. This model allowed us to show that *Yap* deletion leads to deregulation of several Müller cell specific genes. A phenotypic analysis revealed that these molecular deregulations lead to premature aging of Müller cells and visual defects in old mice. These results suggest that YAP is required for normal function of Müller glial cells. We then studied the impact of *Yap* deletion in Müller cells under degenerative conditions. A transcriptomic analysis revealed that various aspects of the molecular response of reactive Müller cells are affected in the absence of *Yap*. Among the deregulated biological processes, we focussed in particular in the regulation of cell proliferation. We found that YAP is required to trigger cell cycle gene upregulation that occurs in Müller glial cells following photoreceptor cell death. Furthermore, our results suggest that some components of the EGFR signaling pathway, which is known for its central role in the reactivation of Müller cells in pathological conditions, are regulated by YAP in Müller cells.

Taken together, these results highlight the importance of YAP (*i*) in Müller cell function under physiological conditions to maintain retinal homeostasis, and (*ii*) in the regulation of Müller cell reactivation process under degenerative conditions. Moreover, these data allow us to propose a model in which YAP would be involved in the control of Müller glia cell cycle re-entry through its interaction with the EGFR signaling pathway. Therefore, this work has contributed to increase our knowledge of the signaling network involved in the reactivation of Müller cells in the mammalian retina.