

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE II

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE II

Discipline : Sciences de la vie et de la Santé

Présentée par

Matthieu CORVAISIER

**Implication des co-activateurs transcriptionnels YAP/TAZ dans la
régulation entre la croissance et la dormance tumorale des cellules du
cancer colorectal**

Mécanismes moléculaires et perspectives thérapeutiques.

Thèse dirigée par Madame le Docteur Guillemette HUET

Soutenue le 29 Novembre 2016

Devant le jury composé de :

Monsieur le Docteur Mario Pende

Monsieur le Professeur Gérard Zalcman

Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen

Madame le Docteur Guillemette Huet

Remerciements

Ce travail de Thèse a été effectué au sein de l'équipe

"Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales"

Directrice d'équipe : **Madame le Docteur Isabelle Van Seuning**

Centre de recherche Jean-Pierre Aubert, UMR-S 1172

INSERM - Université de Lille - CHRU de Lille

sous la direction scientifique de **Madame le Docteur Guillemette Huet**

Remerciements

Ce manuscrit est l'aboutissement de mes quatre années passées au sein de l'équipe "Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales". Au travers de cette partie remerciements, je tiens à faire part de ma gratitude, de mon amitié et mon respect pour tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement,

Monsieur le Docteur Luc Buée, directeur de l'UMR-S 1172, pour m'avoir accueilli au sein du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert où j'ai pu effectuer ce travail.

Monsieur le Professeur Pierre Formstecher, directeur du Centre sous son ancienne dénomination (ex UMR n°837) **et Madame le Docteur Renata Polakowska**, pour m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche pour mon stage de Master 2 au sein du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert. Merci de m'avoir initié à ce champ de recherche qu'est l'étude des cellules souches cancéreuses.

Madame le Docteur Isabelle Van Seuning qui m'a accueilli au sein de son équipe depuis maintenant 4 années. Merci Isabelle pour tous vos conseils, vos remarques et discussions que nous avons pu avoir durant ces années.

Madame le Docteur Guillemette Huet pour m'avoir encadré pendant ces 4 années. Merci Guillemette, pour vos conseils, votre disponibilité et votre gentillesse, tout au long de la thèse. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté.

Les rapporteurs de mon jury de Thèse pour l'honneur qu'ils me font : **Monsieur le Docteur Mario Pende** et **Monsieur le Professeur Gérard Zalzman**. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Bruno Quesnel, directeur de l'Axe Dormance Tumorale du SIRIC ONCOLille pour le soutien financier que j'ai reçu pour prolonger mon travail de Thèse.

Madame le Professeur Emmanuelle Leteurtre ainsi que **Madame le Docteur Florence Renaud** du service d'Anatomo-pathologie du CHRU de Lille, pour leur disponibilité et leur aide précieuse lors des analyses immunohistochimiques.

Madame le Professeur Patricia Melnyk et **Monsieur le Professeur Philippe Cotelle** ainsi que leur équipe pour le soutien financier qu'ils m'ont apporté au début de cette année 2016. Ce fut une expérience enrichissante que d'être associé à ce projet de *drug design*

Remerciements

et à la rédaction de notre revue. J'espère que la collaboration chimie/biologie sur les inhibiteurs de YAP/TEAD portera bientôt ses fruits.

Madame le Professeur Xuefen le Bourhis et **Monsieur le Professeur Philippe Delannoy** pour leurs remarques et conseils avisés durant mes comités de suivi de Thèse.

Aux chirurgiens des services de chirurgie viscérale du CHRU de Lille dirigés par **Monsieur le Professeur Francois-René Pruvot** et **Monsieur le Professeur Christophe Mariette**, passés par notre laboratoire pour une année de Master ou trois années (ou plus) de bonheur en tant que doctorant. Merci d'apporter vos yeux de cliniciens sur nos projets, pour ne jamais perdre de vue le fait que l'horizon est le patient, pas la lignée cellulaire ou la souris.

Madame le Professeur Stéphanie Truant : Merci Stéphanie pour votre confiance et le financement de la dernière partie de ma Thèse. Je vous remercie également pour votre technicité lors de la réalisation des xéno greffes intraportales. J'espère que nous valoriserons ces données au plus vite.

Monsieur le Docteur François Corfiotti : depuis ton Master 2 en 2012, j'ai trouvé en toi un ami indéfectible. Je repense avec plaisir aux nombreuses immunofluorescences sur le week-end, aux cafés et discussions qu'ils amènent, aux samedis matins à l'animalerie ou à faire du recueil de données, aux repas au "Café des Nates" ensemble. Les 4CDD furent, sont et seront à jamais! Je te souhaite le meilleur pour la suite, au labo, au bloc, et en dehors!

Monsieur le Docteur Mehdi El Amrani : comment perdre son optimisme et sa motivation quand tu es dans les parages! Tu as su insuffler en moi une partie infime de l'énergie qui bout en toi pour me dépasser durant ma deuxième année de thèse. Ne perds pas cette formidable envie!

Monsieur le Docteur Maxence Fulbert et **Monsieur le Docteur Maxime Warlaumont** : comme vous dissociez est un crime, j'en profite pour vous remercier en simultané tous les deux pour l'année passée ensemble.

Je remercie également **Madame le Docteur Flora Hec**, **Madame le Docteur Anne Gandon** et la toute jeune maman **Madame le Docteur Marguerite Messier** pour les bons moments passés avec elles.

Remerciements

À mes anciens camarades,

Monsieur le Docteur Nicolas Poret, je me souviens encore avec plaisir de mon Master 2 en 2011, pendant ta première année de Thèse. Bien que cela commence à remonter un petit peu, je n'oublierai pas les fous rires au labo et surtout en dehors (ce qui se passe au Carnaval reste au Carnaval ...). Tu es resté pour moi un modèle de volonté et de refus du renoncement dans les moments difficiles qui jalonnent le travail du thésard. Je te souhaite le meilleur pour la suite, bien que ce soit déjà bien engagé à ce niveau!

Monsieur le Docteur Romain Vasseur, après ces 3 années passées ensemble dans l'équipe, nos chemins se séparent! Garde toujours intact ton optimisme et ta bonne humeur, ainsi que ton insatiable soif de café!

Madame Marjolaine Bauzone, toute fraîchement reçue au concours doctoral, je te souhaite de garder ta motivation pour ces trois années qui arrivent! Merci pour ton implication et ton sérieux dans le travail dès le Master 2, ça laisse présager de belles choses pour la suite!

Aux membres de l'équipe,

Aux chercheurs **Madame le Docteur Audrey Vincent**, **Monsieur le Docteur Michael Perrais** et **Monsieur le Docteur Nicolas Jonckheere**, pour leurs conseils avisés, leurs amitiés et les discussions informelles partagées durant ces années.

À **Madame le Docteur Fatima Lahdaoui**, **Monsieur Mouloud Souidi**, **Madame Brigitte Hémon**, **Madame Kelly Gaudelot**, **Madame Marie-Paule Ducourouble**, **Madame Céline Schulz**, et aux autres membres de l'équipe, merci pour votre aide et votre amitié, à chaque moment de ces presque 1500 jours passés en tant que doctorant à vos côtés.

Enfin, sur un plan plus personnel,

À ma **famille**, mes **parents Patrick** et **Patricia** et ma **petite soeur Clémentine** pour tout ce qu'ils m'apportent et chez qui je vais me ressourcer en Anjou lorsque le besoin s'en fait ressentir! Merci pour tout, simplement.

À **Pauline**, qui partage ma vie depuis 8 ans déjà, à Angers, à Lille et ailleurs dans un futur proche. Je ne saurais exprimer tout ce que tu me donnes, tous les jours. Je te dis tout simplement, merci, merci pour tout.

Remerciements

Je remercie

Le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

La Région Nord-Pas-de-Calais-Picardie

Le SIRIC ONCOLille

La Ligue Nationale Contre le Cancer, La Fondation ARC pour la Recherche contre le Cancer

Pour leur soutien financier qui a permis la réalisation de ces travaux

Valorisation des travaux

Ce travail et les recherches réalisées ont été valorisés sous la forme de :

Articles publiés - revue publiée

Regulation of cellular quiescence by YAP/TAZ and Cyclin E1 in colon cancer cells: Implication in chemoresistance and cancer relapse. *Oncotarget*, 2016

Matthieu Corvaisier, Marjolaine Bauzone, François Corfiotti, Florence Renaud, Mehdi El amrani, Didier Monté, Stéphanie Truant, Emmanuelle Leteurtre, Pierre Formstecher, Isabelle Van Seuningen, Christian Gespach, Guillemette Huet.

Colon cancer cells escape 5FU chemotherapy-induced cell death by entering stemness and quiescence associated with the c-Yes/YAP axis. *Clinical Cancer Research*, 2014

Yasmine Touil, Wassila Igoudjil, **Matthieu Corvaisier**, Anne-Frédérique Dessen, Jérôme Vandomme, Didier Monté, Laurence Stechly, Nicolas Skrypek, Carole Langlois, Georges Grard, Guillaume Millet, Emmanuelle Leteurtre, Patrick Dumont, Stéphanie Truant, François-René Pruvot, Mohammed Hebbar, Fan Fan, Lee M. Ellis, Pierre Formstecher, Isabelle Van Seuningen, Christian Gespach, Renata Polakowska, Guillemette Huet.

Non-Photoinduced Biological Properties of Verteporfin. *Current Medicinal Chemistry*, 2016

Floriane Gibault, **Matthieu Corvaisier**, Fabrice Bailly, Guillemette Huet, Patricia Melnyk, Philippe Cotelte.

Valorisation des travaux

Article en cours de soumission

Gemcitabine-induced EMT-like changes sustain chemoresistance of pancreatic cancer cells.

Mehdi El amrani, François Corfiotti, **Matthieu Corvaisier**, Maxence Fulbert, Cécile Skrzypczyk, Anne-Claire Deshorgues, Viviane Gnemmi, David Tulasne, Fatima Lahdaoui, Audrey Vincent, François-René Pruvot, Isabelle Van Seuning, Guillemette Huet, Stéphanie Truant.

Communications orales

2016 Corvaisier et al. Implication des co-activateurs transcriptionnels YAP/TAZ dans la régulation entre la croissance et la dormance tumorale des cellules du cancer colorectal Mécanismes moléculaires et perspectives thérapeutiques. **Congrès du CECED (Lille)**

Prix de la communication orale <http://www.mgps.eu/ceced/>

2015 Corvaisier et al. Marqueurs et mécanismes de dormance de cellules tumorales coliques sous chimiothérapie : Implication de la protéine kinase c-Yes et du co-activateur transcriptionnel YAP. **8ème symposium scientifique du Cancéropôle Nord-Ouest (Deauville)**

2015 Corvaisier et al. Marqueurs et mécanismes de dormance de cellules tumorales coliques sous chimiothérapie : Implication de la protéine kinase c-Yes et du co-activateur transcriptionnel YAP. **Journée des doctorants du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert (Lille)**

Communications par affichage

Journées Jeunes Chercheurs de l'ARC (23-24 Octobre 2013, Cité Universitaire de Paris)

7èmes Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest (14-16 mai 2014, Deauville)

1er symposium sur la dormance tumorale, SIRIC ONCOLille (26 Juin 2014, Lille)

14ème Journée des doctorants "Journée André Verbert" de l'Ecole Doctorale de Lille (11 Septembre 2014, Lille)

Résumé & Abstract

Résumé

Le cancer colorectal est la première pathologie cancéreuse de la sphère digestive, tant en terme de fréquence que de mortalité par an. Chaque année, 41 000 nouveaux cas sont diagnostiqués et 17 000 décès sont dus à ce cancer en France. Deux paramètres cliniques expliquent la mortalité de ce cancer; d'une part le fait qu'un patient sur deux soit diagnostiqué au stade métastatique, ou va développer des lésions métastatiques durant l'histoire de sa pathologie, d'autre part le fait que les patients après traitement vont fréquemment présenter une récurrence tumorale. L'utilisation de régimes de chimiothérapies avant et après résection métastatique améliore la survie sans récurrence à court terme, mais à 3 ans post chirurgie l'avantage apporté est perdu. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'échappement à la chimiothérapie et régissant la croissance tumorale est d'intérêt pour tenter de limiter la récurrence tumorale.

L'objectif de ce travail de thèse a consisté en l'analyse de sous-populations obtenues sous pression de chimiothérapie au 5-Fluorouracile (5FU) dérivées de la lignée cancéreuse colique HT29, ainsi que les mécanismes moléculaires associés. Notre clone le plus chimiorésistant isolé, le modèle cellulaire 5F31, quitte le compartiment prolifératif sous traitement à fortes doses de 5FU, ceci étant associé à une perturbation de la voie de signalisation de la Src kinase c-Yes et de son partenaire, le co-activateur transcriptionnel YAP. Sous traitement, les cellules chimiorésistantes entrent en quiescence, le complexe protéique entre c-Yes et YAP est perdu et la quantité totale et nucléaire de YAP diminue de manière significative (Igoudjil, Touil, Corvaisier *et al.* 2014 *Clinical Cancer Research*). Dès lors, la suite des travaux a consisté en l'étude du rôle potentiel de YAP sur la balance quiescence/prolifération sous 5FU.

L'inhibition pharmacologique ou l'inhibition transitoire de l'expression de YAP et de son paralogue, la protéine TAZ, dans plusieurs lignées cancéreuses coliques induit l'augmentation de la fraction de cellules quiescentes, associée au ralentissement significatif de la croissance tumorale. A l'inverse, la surexpression d'une forme constitutivement active de YAP demeurant nucléaire sous 5FU maintient les cellules 5F31 en prolifération et sensibilise les cellules à la chimiothérapie.

Au niveau des effecteurs protéiques, l'induction de quiescence (par traitement à la chimiothérapie ou inhibition de YAP/TAZ) est associée à la perte d'expression de la Cycline

Résumé & Abstract

E1 et du facteur de transcription c-Myc. A l'inverse, la surexpression du dominant constitutivement actif de YAP dans les cellules 5F31 conduit à l'expression soutenue de la Cycline E1 sous 5FU, expression nécessitant l'activation du facteur de transcription CREB. L'inhibition de la Cycline E1 permet d'induire la quiescence cellulaire, proposant cette protéine comme l'un des effecteurs des protéines YAP/TAZ dans la régulation entre la quiescence et la prolifération cellulaire (Corvaisier *et al*, Oncotarget, 2016).

En conclusion, nos données montrent l'importance du rôle des protéines YAP/TAZ dans le maintien des cellules en prolifération via l'expression notamment de la Cycline E1. Nos résultats sur cohorte de patients atteints de métastases hépatiques de cancers colorectaux montrent que l'expression des co-activateurs YAP/TAZ est liée à un index prolifératif plus important, confortant nos données sur le rôle de ces protéines dans la croissance tumorale. De plus, l'expression élevée de YAP et TAZ est associée en analyses multivariées à une récurrence plus précoce et à une survie globale plus faible. Ainsi, l'étude de l'expression et du niveau d'activation de ces acteurs serait un marqueur pronostique intéressant dans l'anticipation de la récurrence métastatique, ainsi que des cibles thérapeutiques intéressantes pour tenter de limiter la rechute tumorale.

Résumé & Abstract

Abstract

Colorectal cancer is the most frequent and lethal cancerous pathology from the digestive system. Each year in France, 41 000 new cases are diagnosed and 17 000 patients die due to this pathology. This high mortality is mainly due to the rate of patients with liver metastatic lesions and the early relapse of those metastases after treatment. The use of chemotherapy prior to surgery induces a decrease of early relapse, however 3 years after resection this advantage is lost. Thus, understanding the mechanisms underlying escape to treatment is required to try to delay or prevent tumor recurrence.

The aim of this doctoral work was to analyse clonal chemoresistant subpopulations derived from the colorectal cancer cell line HT29 after chronic exposure to 5-Fluorouracil (5FU) and molecular mechanisms associated with chemoresistance. The most chemoresistant clonal subpopulation, 5F31, stops its proliferation after treatment with high dose of 5FU, this behavior being associated with the modulation of the c-Yes/YAP axis. After treatment, 5F31 cells enter quiescence, interaction between c-Yes and YAP is lost and total and nuclear YAP protein expression reduces significantly (Igoudjil, Touil, Corvaisier *et al.* 2014, Clinical Cancer Research). The next step was to study functions of YAP protein in this chemotherapy-induced quiescence.

Pharmacological or transient inhibition of YAP and its paralog TAZ, induces quiescence and reduces cellular growth in several colorectal cancer cell lines. On the other hand, overexpression of a constitutively active form of YAP in 5F31 cells forces cells to remain proliferative under 5FU treatment, enhancing 5F31 cell chemosensitivity to 5FU.

Regarding proteic effectors, quiescence (either induced by 5FU or YAP/TAZ inhibition) is associated with loss of expression of the transcription factor c-Myc and Cyclin E1. In 5F31 cells expressing the active mutant form of YAP, Cyclin E1 expression is sustained after 5FU treatment through the activation of the transcription factor CREB. Cyclin E1 inhibition is sufficient to induce quiescence, therefore introducing this protein as one of the final effectors of YAP/TAZ co-activators in the regulation of the proliferation/quiescence switch in colorectal cancer cells (Corvaisier *et al.* 2016, Oncotarget).

Résumé & Abstract

To conclude, our work reveals the importance of YAP/TAZ proteins for the maintenance of colorectal cancer cells proliferation through Cyclin E1 expression. Our work on liver metastases from patients with colorectal cancer shows that high expression of YAP/TAZ is connected to a higher proliferative index in metastatic lesions. Moreover, high YAP/TAZ expression is associated with shorter patient progression-free survival and shorter overall survival. Studying the expression and level of YAP/TAZ activation could be an interesting prognosis marker to anticipate metastatic relapse and potent druggable target to delay tumoral recurrence.

Sommaire

Liste des abréviations	1
Introduction	3
I Cancer colorectal (CCR)	3
Organisation du côlon sain et de la crypte colique	3
Organisation et populations cellulaires de la crypte colique.....	4
Histologie du CCR.....	6
Epidémiologie et statistiques du CCR	7
Classification histopathologique du CCR.....	8
Syndromes familiaux de CCR	10
Classifications moléculaires des CCR en fonction de l'instabilité génomique	10
Mutations et voies de signalisations impliquées dans le CCR.....	12
Nouvelle classification moléculaire des CCR : analyses transcriptomiques	13
Prise en charge thérapeutique du CCR	14
Résistance à la chimiothérapie dans le traitement des MHCCR.....	20
II Voie Hippo.....	23
Découverte de la voie Hippo.....	23
YAP/TAZ : Les effecteurs terminaux de la voie Hippo	25
Modèles mammifères sur la voie Hippo	26
Interactome des protéines YAP et TAZ.....	28
Description de l'interaction entre YAP/TAZ et TEAD	30
Gènes cibles de YAP/TAZ.....	31
Régulation transcriptionnelle de YAP et TAZ.....	32
Implication de la voie Hippo dans les processus cancéreux	42
Objectifs du travail	57
Résultats	58
I Etude des mécanismes de quiescence chimio-induite.....	58
1.1 Caractérisation de modèles chimiorésistants du CCR	58
1.2 Réponses variables à la réexposition à la chimiothérapie.....	61
1.3 Mécanismes cellulaires et moléculaires induits par la chimiothérapie.....	63
1.4 Etude du rôle de la Src kinase c-Yes dans le modèle 5F31	65

1.5 Analyse de l'expression des transcrits de YAP et c-Yes dans une cohorte de métastases hépatiques de patients	68
Conclusion de la partie I	70
II Etude du rôle de YAP et de son paralogue TAZ dans la régulation de la balance prolifération/quiescence cellulaire.....	71
2.1 Inhibition de YAP et retentissement sur le cycle cellulaire des cellules 5F31	71
2.2 Rôle de YAP dans l'acquisition de propriétés de cellules souches.....	73
2.3 Transfection de YAP constitutivement actif et réponse à la chimiothérapie	74
2.4 Cibles fonctionnelles de YAP impliquées dans l'induction de quiescence	80
2.5 Extension du rôle de YAP et de son paralogue TAZ sur les propriétés tumorales des lignées de CCR	82
2.6 Modulation de la balance prolifération/quiescence par YAP/TAZ	83
2.7 Modulation des propriétés invasives par YAP et TAZ.....	87
2.8 Dominant constitutif de YAP et blocage de l'entrée en quiescence.....	90
2.9 Dégradation de la protéine YAP sous 5FU	92
III Analyse de YAP/TAZ dans des métastases humaines de cancers colorectaux	94
3.1 Expression de YAP/TAZ et caractéristiques clinicobiologiques associées	94
3.2 Expression de YAP/TAZ et association avec l'Index de prolifération.....	95
3.3 Expression de YAP/TAZ et association avec les données de survie globale et sans récurrence des patients	97
3.4 Synergie entre YAP/TAZ et CREB sur la survie des patients atteints de CCR.....	100
Conclusion des parties II et III.....	102
Discussion	104
Quiescence cellulaire et récurrence métastatique	104
Régulation de la quiescence : rôle de la Cycline E1	105
Quiescence cellulaire et voies de dégradation	106
YAP/TAZ et reprise de prolifération cellulaire	107
Relation entre YAP/TAZ et CREB	109
Appendice technique	112
A. Cohorte de patients	112
B. Biologie cellulaire	113
Lignées cellulaires et conditions de culture	113
Transfection des lignées cellulaires	114
Conditions de culture	116

Modulation des propriétés biologiques	117
C. Biologie moléculaire	123
Analyse de l'expression des transcrits	123
Analyse transcriptomique	123
Production d'un plasmide rapporteur TEAD-Luciférase.....	128
D. Biochimie.....	130
Analyse protéique	130
Immunohistochimie	136
Etude de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription TEAD par test luciférase	139
E. Analyses statistiques des données	140
Bibliographie.....	141
Annexes.....	162
Annexe n°1 Analyse transcriptomique des 5F31 Ctrl vs 5F31 YAPdc.....	163
Annexe n°2 Analyse transcriptomique des 5F7 Ctrl vs 5F7 YAPdc.....	165

Liste des abréviations

5FU : 5-Fluorouracile

AA : Acide Aminé

Abl : *Abelson murine leukemia viral oncogene*

AMOT/AMOT-L1/L2 : *Angiomotine/Angiomotine-Like1/ Angiomotine-Like2*

APC : *Adenomatous Polyposis Coli*

Bmi-1 : *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*

β -Trcp : *β -Transducin repeat-containing E3 ubiquitine ligase*

CCR : Cancer ColoRectal

Chk-2 : Checkpoint kinase 2

CIMP : *cPG Island Methylated Phenotype*

CMS : *Consensus Molecular Subtype*

Cox2 : Cyclo-oxygénase-2

CREB : *cAMP Response Element Binding protein*

CSC : Cellule Souche Cancéreuse

CTGF : *Connective Tissue Growth Factor*

Cyr61 : *Cysteine-rich angiogenic inducer 61*

DSS : Dextran Sulfate de Sodium

EGF/EGF-R : *Epidermal Growth Factor/Epidermal Growth Factor Receptor*

Glul : Glutamine Synthétase

LATS1/2 : *LArge Tumor Suppressor 1/2*

Lgr5 : *Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*

LPA : acide lysophosphatidique

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MHCCR : Métastases Hépatiques de Cancers ColoRectaux

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

MMR : *MisMatch Repair*

MSI : MicroSatellitaire Instable

MSS : MicroSatellitaire Stable

MST1/2 : *Mammalian Sterile20-like kinase 1/2*

mTORC1 : *mammalian Target of Rapamycin complex 1*

MTT : Sels de Tétrazolium

NF2 : *NeuroFibromatosis 2*

NICD : *Notch IntraCellular Domain*

NLS : *Nuclear Localization Signal*
IC₅₀ : *Inhibitory Concentration 50*
IL-6 : Interleukine 6
PAF : Polypose Adénomateuse Familiale
PGE₂ : Prostaglandine E2
PKA : Protéine Kinase A
RASSF1A : *Ras association domain family 1 isoform A*
RCPG : Récepteur couplé aux protéines G
RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase
S1P : Sphingosine 1-Phosphate
SH : *Src Homology Domain*
SSR : Survie Sans Récidive
TEAD : *TEA Domain family member*
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF-β : *Transforming Growth Factor β*
Tsc1/2 : *Tuberous Sclerosis Protein 1/2*
VEGF/VEGF-R : *Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*
VGLL1-4 : *Vestigial Like Proteins 1-4*
VP : Vertéporphine
Wnt : *Wingless*
WWTR1 : *WW domain containing transcription regulator 1*
YAP : *Yes Associated Protein*

Introduction

I Cancer colorectal (CCR)

Organisation du côlon sain et de la crypte colique

Anatomie et histologie du côlon

Le côlon est la portion distale du tube digestif, allant de la valvule iléo-caecale jusqu'au rectum ; il comprend le caecum, le côlon droit (côlon ascendant), le côlon transverse, le côlon gauche (côlon descendant), le côlon sigmoïde et le rectum. La partie proximale du côlon, jusqu'au deux-tiers du côlon transverse, provient au niveau embryologique, de l'intestin primitif moyen et est vascularisé par les branches issues de l'artère mésentérique supérieure. La partie distale, à partir du dernier tiers du côlon transverse, est issue de l'intestin primitif postérieur et la vascularisation est assurée par les branches de l'artère mésentérique inférieure. Physiologiquement, le côlon est le lieu de l'absorption de l'eau (au niveau de sa partie proximale), de glucides et de protéines ainsi que de la compaction et de la formation des selles.

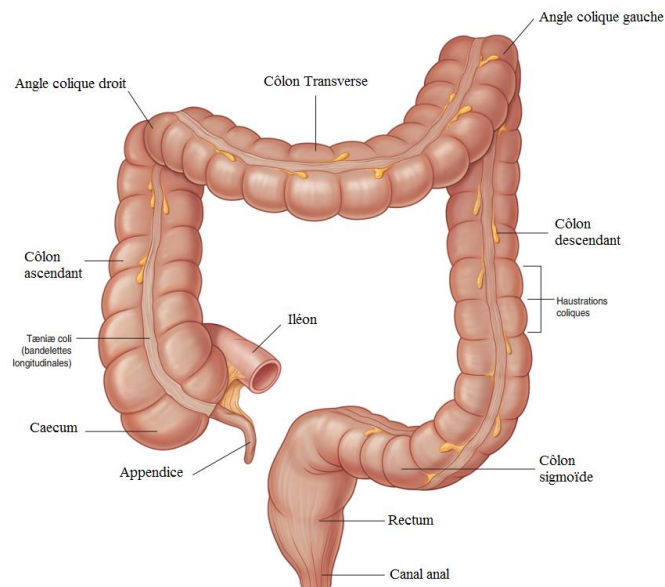


Figure n°1 Organisation anatomique du côlon. Schéma issu de la société nationale française de gastro-entérologie. http://www.snfge.org/sites/default/files/SNFGE/Formation/chap-4_fondamentaux-pathologie-digestive_octobre-2014.pdf Le côlon délimite un cadre, enchâssé dans la cavité abdominale, d'1,5 mètre de long et de 4 centimètres de diamètre.

Le côlon est composé de quatre couches histologiques différentes : la muqueuse colique en contact avec la lumière intestinale, puis la sous-muqueuse, la musculuse et enfin la séreuse (mésocôlon ou mésorectum). La muqueuse colique contient du tissu conjonctif stromal ou chorion, une membrane basale, une musculaire muqueuse, ainsi que la partie effectrice de l'organe, l'épithélium colique. A la différence de l'épithélium intestinal, l'épithélium colique ne présente pas de villosités à sa surface. Il s'agit d'un épithélium glandulaire, comprenant des invaginations, les cryptes coliques ou glandes de Lieberkühn.



Figure n°2 Histologie du côlon et de la muqueuse colique. Photographies issus du Collège Français des Pathologistes. Les croix figurant sur le cliché marquent les glandes de Lieberkühn. http://campus.cerimes.fr/anatomiepathologique/enseignement/anapath_18/site/html/1.html

Organisation et populations cellulaires de la crypte colique

Les cryptes coliques (et intestinales) représentent l'unité fonctionnelle de l'organe, possédant les fonctions d'absorption et de sécrétion dans la lumière intestinale. Chaque crypte est constituée de plus ou moins 250 cellules de différents types, des cellules différenciées gérant la fonction de l'organe, et des cellules souches et progéniteurs, cellules indifférenciées, s'occupant du renouvellement permanent et intense de l'épithélium colique (l'épithélium étant renouvelé tous les 5-7 jours). Il existe un gradient de différenciation du fond de la crypte colique vers son sommet ; les cellules souches et les progéniteurs sont dans le fond de la crypte et les cellules vont se différencier le long de cet axe dans les différents types cellulaires, sous l'influence de gradients de ligands présents dans la matrice stromale.

Les cellules différenciées sont de 3 types principaux dans la crypte colique ; les colonocytes, cellules en charge de l'absorption de l'eau et des nutriments, les cellules entéro-endocrines, sécrétant les hormones telles que la sérotonine, la sécrétine ou la substance P, ainsi que les cellules caliciformes sécrétant la mucine Muc2, composante du mucus colique servant à la protection de l'épithélium. Les cellules de Paneth, aux rôles anti-microbiens, sont rarement détectées dans les cryptes du côlon, au contraire des cryptes intestinales où elles sont retrouvées dans le fond des cryptes.

Les cellules souches de l'intestin et du côlon sont présentes dans le fond de la crypte et vont être capables de générer les autres types cellulaires précédemment cités. Le débat reste ouvert à savoir s'il n'existerait pas deux populations de cellules souches intestinales/coliques, les cellules souches identifiées par le marqueur de surface Lgr5 (*Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5*) du fond de la crypte (Sato et al., 2009) et les cellules dites « position +4 » des cryptes intestinales, cellules majoritairement quiescentes et exprimant la protéine Bmi-1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*).

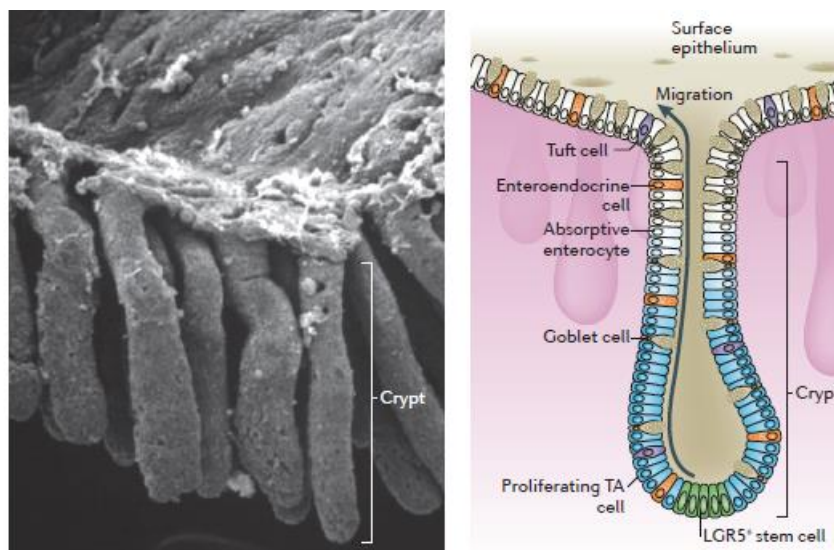


Figure n°3 Observation microscopique et organisation de la crypte colique (Barker, 2014). La crypte colique s'organise du fond de la crypte vers le haut, avec les cellules souches Lgr5+ au fond, les cellules progénitrices en aval dont la prolifération et la différenciation vont aboutir au renouvellement des cellules différenciées de l'épithélium. Les cellules vont migrer, puis mourir par apoptose au sommet de la crypte.

Histologie du CCR

Le côlon, tissu en perpétuel renouvellement, est le siège du développement de tumeurs épithéliales. Au niveau histologique, la grande majorité des tumeurs colorectales sont des adénocarcinomes (plus de 90% des tumeurs colorectales, les 10 % restants étant des tumeurs carcinoïdes, des lymphomes, *etc*), tumeurs dérivées d'épithéliums glandulaires, majoritairement lieberkühniens (dans plus de 95% des cas), c'est à dire conservant une architecture semblable à l'épithélium sain. Dans ce travail, nous ferons l'approximation et assimilerons les tumeurs colorectales aux adénocarcinomes lieberkühniens, sous la terminologie de cancer colorectal (CCR).

Au niveau anatomique, les CCR se répartissent le long de la section du tube digestif qu'est le côlon (75% des CCR, dont 30% du caecum jusqu'au côlon transverse) ainsi que le rectum (25% des cas). Les pathologistes peuvent évaluer le degré de différenciation de la tumeur (en comparaison du tissu sain) par la fréquence élevée ou non de structures glandulaires en son sein, déterminant ainsi le caractère peu (moins de 50% de structures glandulaires), moyennement (entre 50 et 90%) ou bien différencié (plus de 90%) de celle-ci. Les adénocarcinomes moyennement différenciés représentent la majorité des cas diagnostiqués de CCR par les pathologistes (70%), suivent les adénocarcinomes peu différenciés (20%) et enfin les biens différenciés (10%) (Fleming et al., 2012).

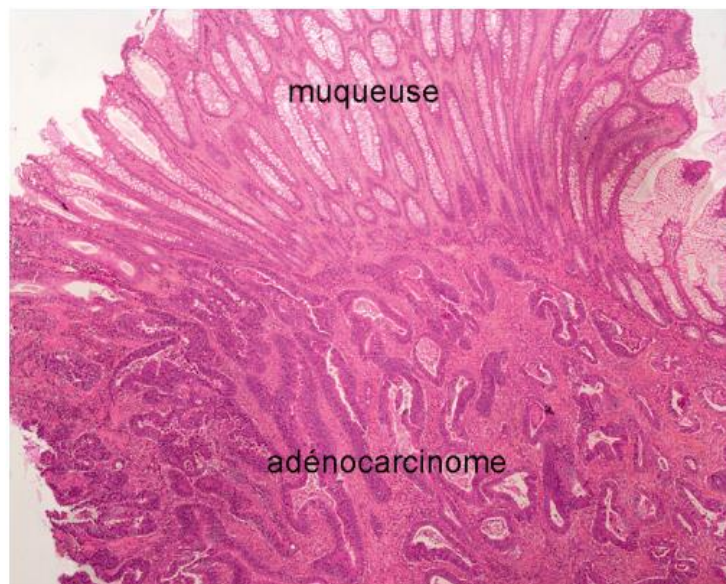


Figure n°4 : Clichés d'observation microscopique d'un adénocarcinome colorectal lieberkühnien.
http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_18/site/html/2.html.

Epidémiologie et statistiques du CCR

Le cancer colorectal est à travers le monde la troisième pathologie cancéreuse, tous sexes confondus, la plus fréquente. C'est le premier cancer de la sphère digestive avec plus d'1,2 million de nouveaux cas diagnostiqués par an et près de 700 000 décès (Torre et al., 2015) (quatrième cancer le plus mortel après le cancer du poumon, du foie et de l'estomac dans le monde (Kuipers et al., 2015)). Selon les chiffres de l'Institut National du Cancer (INCa, 2011), 41 000 nouveaux cas de CCR sont diagnostiqués chaque année et ce cancer est responsable du décès de 17 000 patients par an en France. L'incidence de ce cancer est la plus fréquente en Europe, en Amérique du Nord et en Océanie (principalement en Australie).

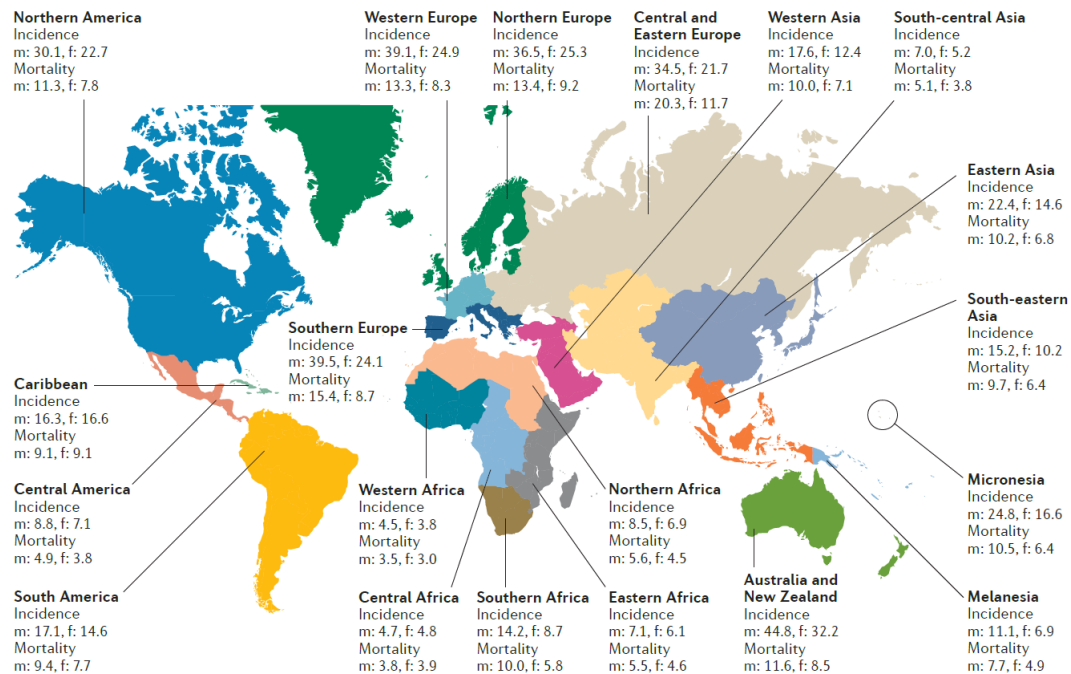


Figure n°5 : Incidence et mortalité du CCR à travers le monde. L'incidence et la mortalité relatives du CCR (pour les hommes (m) et femmes (f) figure sous chaque ensemble géographique) sont précisées pour 100 000 habitants. Représentation graphique (Kuipers et al., 2015) des données du site de l'OMS disponible en ligne http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.

Les cancers colorectaux sont majoritairement des cas sporadiques (70-80% des cas, les 20-30 pourcents restants étant liés à des prédispositions génétiques, des syndrômes familiaux caractérisés dans 5% des cas). Les facteurs de risque connus de développement d'un cancer colorectal sont l'âge du sujet, avec une augmentation de la survenue après 50 ans (l'âge moyen au diagnostic étant de 70 ans), la consommation d'alcool, le tabagisme, et également les antécédents de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (rectocolite hémorragique

ou maladie de Crohn). Cependant, dans le cadre des pathologies inflammatoires, des travaux tendent à montrer que la survenue de CCR sur fond de rectocolites hémorragiques ou de maladie de Crohn baisse, probablement du fait de la prise d'anti-inflammatoires par les patients dans le cadre du contrôle de leur pathologie (Jess et al., 2012). 1% des CCR diagnostiqués dans les pays occidentaux se développent sur fond de MICI.

La survie globale médiane du CCR à 5 ans dans les pays industrialisés est supérieure à 60 % et est au-delà des 50% dans les pays en voie de développement, cependant il existe de grandes disparités de survie en fonction du stade du cancer, passant d'une survie globale à 5 ans de plus de 90% pour les stades localisés (stade I de la classification TNM) à 10 % pour les patients atteints de CCR métastatiques (stade IV, (Gao et al., 2013)). Malgré les avancées de prise en charge et de dépistage plus précoce du CCR aux stades locaux, près de 25% des patients sont diagnostiqués à un stade métastatique (métastases synchrones) et plus de la moitié de l'ensemble des patients développera des métastases à 5 ans après diagnostic (métachrones). Pour la France par an, 9000 patients sont diagnostiqués avec des métastases hépatiques de CCR (MHCCR) (Phelip et al., 2014)(Adam and Vibert, 2014).

Classification histopathologique du CCR

Il est important, en vue d'orienter la thérapeutique, de connaître divers paramètres cliniques de la tumeur, à savoir son envahissement dans la profondeur du tissu sain, ainsi que sa dissémination vers les ganglions périphériques, voire d'autres organes. La classification dite *TNM (Tumor-Node-Metastasis)* suivant des critères histopathologiques repose sur trois critères que sont : la profondeur d'envahissement du tissu local par la tumeur (stade T), l'envahissement du système lymphatique et des ganglions à proximité de la tumeur (stade N) et la présence de métastases dans les organes secondaires (M). Cette classification a pris le pas sur l'ancienne classification de Duke, moins détaillée. L'établissement du statut TNM (actuellement dans sa 7ème édition) dépend de l'analyse anatomopathologique de la pièce opératoire après résection pour la tumeur primaire ainsi que des résultats d'imagerie pour les organes secondaires potentiellement envahis (foie, poumons, *etc*).

TNM Classification (American Joint Commission on Cancer)				Dukes' Classification
Stages	T	N	M	Stages
Stage 0	Tis	N0	M0	
Stage I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	B1
Stage II	T3	N0	M0	B2
	T4	N0	M0	B2
Stage III	T1, T2	N1 or N2	M0	C1
	T3, T4	N1 or N2	M0	C2
Stage IV	Any T	Any N	M1	D

Tableau n°1 : Comparaison entre les classifications TNM et Duke.
http://www.hopkinscoloncancercenter.org/CMS/CMS_Page.aspx?CurrentUDV=59&CMS_Page_ID=EEA2CD91-3276-4123-BEEB-BAF1984D20C7.

Pour le cancer colorectal, la classification TNM est celle qui suit à savoir (pour les différentes composantes du statut TNM) :

T1 : sous-muqueuse
T2 : musculieuse
T3 : sous-séreuse
T4a : pénétration du péritoine viscéral
T4b : envahissement d'un organe de voisinage.

N0 : pas de métastase ganglionnaire
N1a : 1 ganglion envahi
N1b : 2-3 ganglions envahis
N1c : dépôts tumoraux « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péri-colique ou péri-rectal non péritonisé, dans le cadre d'une absence de ganglions lymphatiques métastatiques
N2a : 4-6 ganglions envahis
N2b : > 7 ganglions envahis.

M0 : pas de métastase
M1a : métastases à distance confinées à un organe
M1b : métastases atteignant plus d'un site métastatique ou atteinte du péritoine.

Les données de stade TNM sont issues du thésaurus de chirurgie digestive. C'est à partir de l'association de ces 3 paramètres cliniques que les stades de I à IV sont déterminés.

Syndromes familiaux de CCR

20 à 30% des CCR sont dus à des prédispositions génétiques. Parmi ces 30%, les syndromes familiaux dont l'étiologie est connue représentent moins de 5% et impliquent une dizaine de gènes décrits. Les deux formes les plus fréquentes sont le syndrome de Lynch (Cancer Colorectal Familial sans Polypose) et la Polypose Adénomateuse Familiale (nous ne décrirons pas les autres syndromes plus rares).

Le syndrome de Lynch est le plus fréquent de ces syndromes (2-3% des CCR totaux) et est de transmission de type autosomique dominant. Ce syndrome touche des individus plus jeunes (moins de 50 ans) que pour les CCR sporadiques. Ces patients présentent des mutations somatiques sur les protéines clés de la réparation des dommages à l'ADN, notamment les protéines du système MMR (*MisMatch Repair*), MLH1 et MSH2. La survenue de CCR (entre 25 et 75% des cas en fonction du sexe avec une pénétrance plus faible chez les femmes) chez ces patients est très importante et s'accompagne d'une sensibilité accrue au développement d'autres tumeurs, telles les tumeurs de l'endomètre pour les femmes ou encore de l'estomac.

La Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) représente 1% de l'ensemble des cas de cancer colorectaux (Jasperson et al., 2010). A 50 ans, 95 % des patients atteints par ce syndrome auront développé un CCR. Ces cas familiaux sont associés à des mutations germinales du gène *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), codant pour la protéine du même nom régulant négativement l'expression et l'activité de la β -Caténine. Les mutations d'*APC* et l'activation soutenue de la voie Wnt/ β -Caténine entraînent le développement de multiples polypes pouvant potentiellement dégénérer vers l'adénocarcinome dans la muqueuse colique (la colectomie étant recommandée quand plus de 20 adénomes sont détectés).

Classifications moléculaires des CCR en fonction de l'instabilité génomique

Les tumeurs colorectales proviennent de la dérégulation des grandes fonctions de l'épithélium colique (prolifération, mort cellulaire, différenciation dans les différents types cellulaires spécialisés de la crypte colique) aboutissant à une prolifération anarchique et non contrôlée de cellules transformées, contribuant à l'évolution vers l'adénome, puis l'adénocarcinome (Hanahan and Weinberg, 2011)(Kinzler and Vogelstein, 1996).

Deux grandes familles de cancers colorectaux existent au regard des événements moléculaires responsables de la cancérogénèse : d'une part les cancers du côlon dit microsatellites stables, MSS (ou *Chromosomal Instability, CIN*) caractérisés par de grands réarrangements chromosomiques, qu'il s'agisse de délétions (de portions géniques contenant les gènes suppresseurs de tumeurs comme *APC, TP53, Smad2*), ou de gains de matériel aboutissant à des cellules tumorales aneuploïdes, d'autre part les cancers colorectaux à instabilité microsatellaire (MSI) caractérisés par la perte de fonction des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN (*MLH1, MSH2, ...*). Les cancers du côlon de type MSS représentent la grande majorité des cas de cancers colorectaux sporadiques (soit plus de 80% des cas de cancer colorectaux)(Jass, 2007).

En marge de ces deux grandes familles, un troisième sous-type de phénotype moléculaire émerge et vient complexifier la stratification des tumeurs ; ce phénotype est caractérisé par une hyperméthylation de nombreux gènes et est nommé CIMP (*CPG Island Methylated Phenotype*). Entre 15 et 20% des CCR sont inclus dans cette catégorie. Ce sous-type particulier est souvent associé avec la mutation de la kinase B-Raf (substitution B-Raf^{V600E} aboutissant à l'activation continue de cette kinase). Par ailleurs, des recouvrements sont à faire puisque des patients présentent ce phénotype hyperméthylé tout en étant MSS ou MSI. La répartition se fait de la manière suivante : deux tiers des tumeurs MSI sont de phénotype CIMP (10% des 15% de CCR) alors que 5% des tumeurs MSS arborent le phénotype CIMP. Ce phénotype hyperméthylé se retrouve préférentiellement chez des patientes âgées et les tumeurs sont localisées dans la partie proximale du côlon (côlon droit). Concernant le pronostic des patients et la réponse à la chimiothérapie, il est connu depuis 2005 que les patients MSS/CIMP+ ont une survie globale et sans récurrence plus faible (ceci se retrouve également pour les patients au stade métastatique) (Popat et al., 2005). Cependant, les chimiothérapies à base de 5-Fluorouracile semblent plus efficaces sur les tumeurs MSS/CIMP+, améliorant la survie globale des patients par rapport aux tumeurs MSS/CIMP- traitées par chimiothérapie. Le sous-type particulier représenté par les tumeurs MSS/CIMP+ seraient des tumeurs issues des adénomes dits festonnés (ou sessiles, forme minoritaire d'adénomes, entre 15% et 30% des cas suivant la littérature) du fait de la sur-représentation des mutations de la kinase B-Raf.

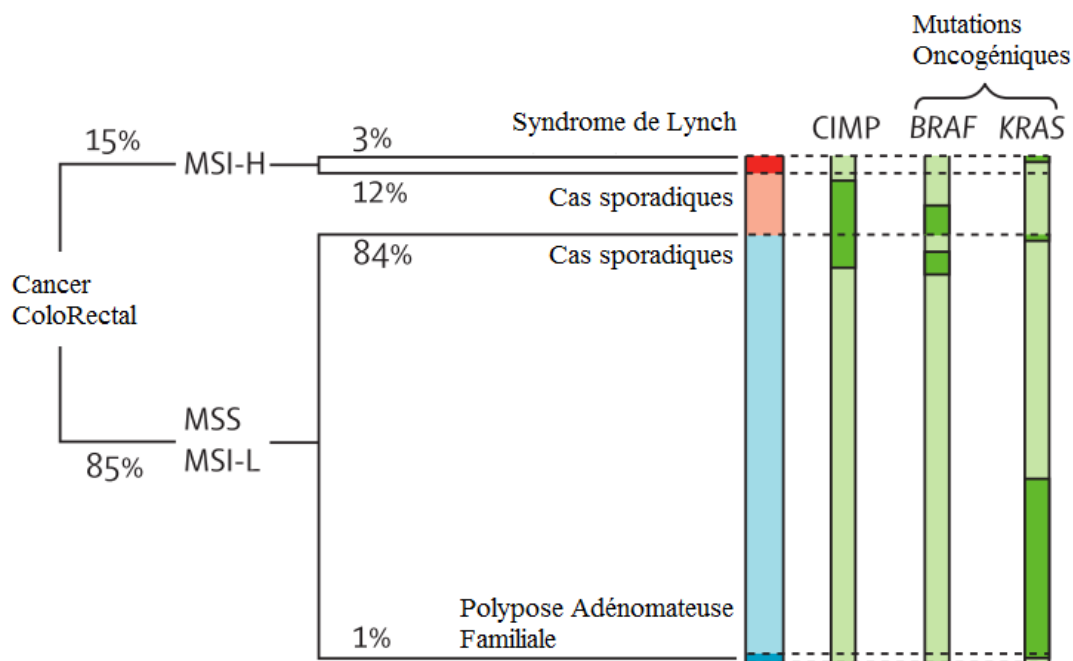


Figure n°6 : Répartition des cancers colorectaux entre MSS et MSI associée aux mutations BRAF ou KRAS, au profil CIMP et aux syndromes familiaux (Brenner et al., 2013). MSI-H : MSI-high. MSI-L : MSI-Low.

Le schéma de la **Figure n°6** représente bien l'imbrication entre les différents phénotypes moléculaires, ainsi que la répartition des cas familiaux dans les cas MSS pour la PAF ou dans les MSI pour les syndromes de Lynch. Concernant les données cliniques des patients présentant une tumeur MSI ou MSS, une méta-analyse de 2005 sur plus de 7 000 patients (dont 1 300 patients MSI *High*) montre que les patients avec une tumeur MSI ont un meilleur pronostic en terme de survie globale, cependant ces derniers ne semblent pas bénéficier d'un traitement adjuvant à base de 5-Fluorouracile (Popat et al., 2005).

Mutations et voies de signalisations impliquées dans le CCR

Le CCR est une pathologie hétérogène faisant intervenir une pléthore de mécanismes génétiques et moléculaires (mutations, amplification, délétion, altération du profil d'expression génique, etc) (Fearon, 2011). Diverses dérégulations de voies de signalisation sont retrouvées dans les CCR, et le plus souvent ne sont pas restreintes à un profil moléculaire donné (MSS, MSI, CIMP+). L'on retrouve mutés dans les CCR de nombreux oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs décrits dans tous types de cancer : la GTPase Kras (40% des CCR, principalement des substitutions dans le 12ème codon aboutissant à l'activation constitutive de la protéine, **Tableau n°2**), la tyrosine kinase B-Raf (5-10% des cas, substitution aboutissant également à l'activité constitutive de la kinase).

Gene	Type of mutation	Estimated frequency of alterations
Oncogenes		
<i>KRAS</i>	Point mutations (codons 12, 13, 61)	40% (>75% of mutations are at codon 12)
<i>NRAS</i>	Point mutations (codons 12, 13, 61)	<5%
<i>PIK3CA</i>	Point mutations activating kinase activity	15–25%
<i>BRAF</i>	Point mutations activating kinase activity (e.g., <i>V600E</i>)	5–10% (mutations linked to CIMP-positive CRCs)
<i>EGFR</i>	Gene amplification	5–15%
<i>CDK8</i>	Gene amplification	10–15%
<i>CMYC</i>	Gene amplification	5–10%
<i>CCNE1</i>	Gene amplification	5%
<i>CTNNB1</i>	Stabilizing point mutations and in-frame deletions near N terminus	<5%
<i>NEU (HER2)</i>	Gene amplification	<5%
<i>MYB</i>	Gene amplification	<5%
Tumor-suppressor genes		
<i>p53</i>	Point mutation, allele loss	60–70% (>95% of point mutations are missense)
<i>APC</i>	Frameshift, point mutation, deletion, allele loss	70–80% (nearly all mutations lead to truncated proteins)
<i>FBXW7</i>	Nonsense, missense, deletion	20%
<i>PTEN</i>	Nonsense, deletion	10%
<i>SMAD4</i>	Nonsense, missense, allele loss	10–15%
<i>SMAD2</i>	Nonsense, deletion, allele loss	5–10%
<i>SMAD3</i>	Nonsense, deletion	5%
<i>TGFβIIIR</i>	Frameshift, nonsense	10–15% (>90% of MSI-H CRCs have mutations)
<i>TCF7L2</i>	Frameshift, nonsense	5% (mutations in both MSI-H and MSS CRCs)
<i>ACVR2</i>	Frameshift	10% (>80% of MSI-H CRCs have mutations)
<i>BAX</i>	Frameshift	5% (often one allele in ~50% of MSI-H CRCs)

Tableau n°2 : Liste des oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs altérés dans les CCR. Le pourcentage ainsi que la nature de l'altération génique (amplification, délétion, mutation faux sens) sont précisés pour chaque gène. MSHI-H : MSI High. (Fearon, 2011)

La mutation la plus fréquente retrouvée dans les CCR sporadiques est la mutation du gène *APC*, mutation conduisant à son inactivation (dans près de 80% des CCR). Il est intéressant de noter que le ko conditionnel murin d'*APC* dans la population de cellules souches *Lgr5* positives suffit à lui seul à induire des adénomes coliques dès 35 jours après induction de la recombinaison (Barker et al., 2009). Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs, le gène codant le facteur de transcription *p53* (gène *TP53*) est retrouvé muté dans plus de la moitié des cas. Des travaux conduits sur des cellules souches intestinales humaines (Drost et al., 2015) ont montré que l'inactivation génique par la technologie *CRISPR/Cas9* d'*APC*, *Smad4*, *TP53* et l'introduction de la mutation *KRAS*^{G12D} induit l'acquisition de propriétés de cellules cancéreuses à ces cellules souches normales.

Nouvelle classification moléculaire des CCR : analyses transcriptomiques

En plus des classifications anatomopathologiques et géniques, depuis 5 ans pas moins de 6 études (Schlicker et al., 2012) (Roepman et al., 2014) (Budinska et al., 2013) (Marisa et al., 2013) (Sadanandam et al., 2013) (Network, 2012) ont tenté de classer les tumeurs coliques

en fonction du profil d'expression des ARNm de la tumeur primitive, sur des cohortes comprenant des milliers de patients. Ces données transcriptomiques ont, suivant les études, été corrélées ensuite avec : la présence des mutations fréquentes des CCR (*APC*, *KRAS*, *BRAF*, *TP53*), le statut *MSS/MSI/CIMP* ainsi qu'avec les données clinico-biologiques disponibles (récidive locorégionale ou métastatique, survie globale, réponse aux biothérapies, etc). Suivant les études, 3 à 6 groupes de CCR ont pu émerger en fonction du profil d'expression génique des tumeurs. De manière remarquable, dans toutes ces études un des sous-groupes, discriminés ainsi de manière aléatoire, est associé à une survie globale plus faible des patients. En terme de prédiction de la survie et de la récurrence tumorale, le profil phénotypique est plus puissant que la présence d'une mutation ou qu'une signature génétique de type *MSS* ou *MSI* quant à la survie globale ou sans récurrence du patient. Ce CMS (*Consensus Molecular Subtype*) dans les différentes études est dit mésenchymateux, cellule souche, etc, car enrichi en transcrits de cellules souches ou associés à la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). De plus, une résistance aux thérapies anti-EGFR est observée chez les patients métastatiques des groupes mésenchymateux, indépendamment du statut mutationnel de *KRAS*.

Un consensus a vu le jour en 2015 (Guinney et al., 2015) rassemblant les auteurs des 6 analyses préalables, permettant de rassembler ces différentes classifications moléculaires en quatre CMS : *CMS1* (enrichi en tumeurs MSI+/CIMP+, tumeurs *BRAF*^{V600E}), *CMS2* (tumeurs CIN, signature moléculaire dite entérocytaire et activité Wnt élevée), *CMS3* (tumeurs *Kras* mutées, activation des voies du métabolisme), *CMS4* (signature mésenchymateuse et marqueurs de cellules souches). Le sous type *CMS4* est celui associé avec le pronostic le plus sombre pour les patients. Au niveau mutationnel, le sous type *CMS4*, identifié chez près de 25% des tumeurs, contient des tumeurs arborant les mutations des gènes *BRAF* (moins de 10% des cas), *KRAS* (40%), *APC* et *TP53* (plus de 50% des cas pour les deux gènes), ainsi que peu de patients MSI et/ou CIMP+. Dès lors, l'on peut imaginer que la recherche d'un nombre restreint de transcrits parmi les plus spécifiques de chacun de ces 4 sous-groupes permettrait de phénotyper la tumeur d'un patient après exérèse pour mieux orienter la thérapie et le suivi en fonction de l'agressivité supposé de son cancer.

Prise en charge thérapeutique du CCR

Chirurgie du CCR primaire

Nous n'aborderons pas dans ce chapitre la prise en charge pour les formes familiales de CCR, nécessitant une surveillance accrue et plus précoce pour les patients que dans la population générale (notamment les colectomies totales pour les patients atteints de syndrome de Lynch). Le traitement du CCR repose en première intention sur la chirurgie de la tumeur primitive, qu'il s'agisse d'une colectomie totale ou segmentaire pour réséquer la partie atteinte. La résection doit suivre les plans anatomiques, discriminant le côlon droit-transverse et le côlon gauche, dû au fait de la vascularisation sanguine et lymphatique différente entre ces deux parties de l'organe.

La chirurgie de la tumeur primaire est suivie par une chimiothérapie adjuvante pour les cancers du côlon à partir du stade III, celle-ci ayant démontrée son intérêt dans la réduction de la récurrence locale ou métastatique. Cependant, la chimiothérapie type FOLFOX en adjuvant ne montre pas d'intérêt thérapeutique pour le patient pour les stades II (Andre et al., 2015).

Chirurgie des métastases : cas des métastases hépatiques de cancers colorectaux

Le foie étant le site préférentiel de la dissémination métastatique du CCR, la chirurgie hépatique revêt une importance cruciale concernant le pronostic du patient ; en effet, l'impossibilité de réséquer le parenchyme hépatique envahi est associé à une survie globale médiane extrêmement basse (7,5 mois sur une cohorte de plus de 1000 malades colligés (Stangl et al., 1994)). L'exérèse hépatique ne peut être réalisée que si un volume minimal de foie peut être préservé afin d'empêcher l'insuffisance hépatique du patient ; dans les services experts, un volume hépatique de 20/30% restant n'est pas associé avec des complications majeures en post-opératoire (Yigitler et al., 2003). Ces conditions *sine qua none* font qu'une vaste majorité de patients avec métastases hépatiques de cancers colorectaux (MHCCR) ne peuvent être opérés d'emblée ; 4 patients sur 5 sont dans ce cas, du fait d'un volume restant de foie trop faible ou d'un envahissement du tronc vasculaire (envahissement des trois veines hépatiques, etc).

L'utilisation de la chimiothérapie en néo-adjuvant peut induire la régression du volume tumoral et permettre à des patients d'être opérés de leurs métastases ; seuls 15-20% des 80% de patients non résécables peuvent être opérés après adjonction de la chimiothérapie (Adam et al., 2009). Concernant les patients résécables d'emblée, le débat est encore ouvert sur l'intérêt de l'utilisation de la chimiothérapie en péri-opératoire, le seul cas ne nécessitant

pas de chimiothérapie étant la métastase unique métachrone, situation où la chirurgie peut être utilisée sans chimiothérapie au préalable.

Les résections hépatiques sont de deux types, dites classes I et II en fonction de la difficulté du geste chirurgical. Les résections de classe I regroupent les résections de moins de 4 segments hépatiques (sur 8) et laissant à minima 40% du volume hépatique ; les résections de classe II comprennent des gestes chirurgicaux plus complexes, nécessitant une reconstruction vasculaire ou autre. Au niveau du geste chirurgical, l'on distinguera les résections anatomiques ou non anatomiques dites « *wedge resection* ». Les résections anatomiques suivent les plans anatomiques des différents lobes du foie, ce qui n'est pas le cas de la *wedge resection*.

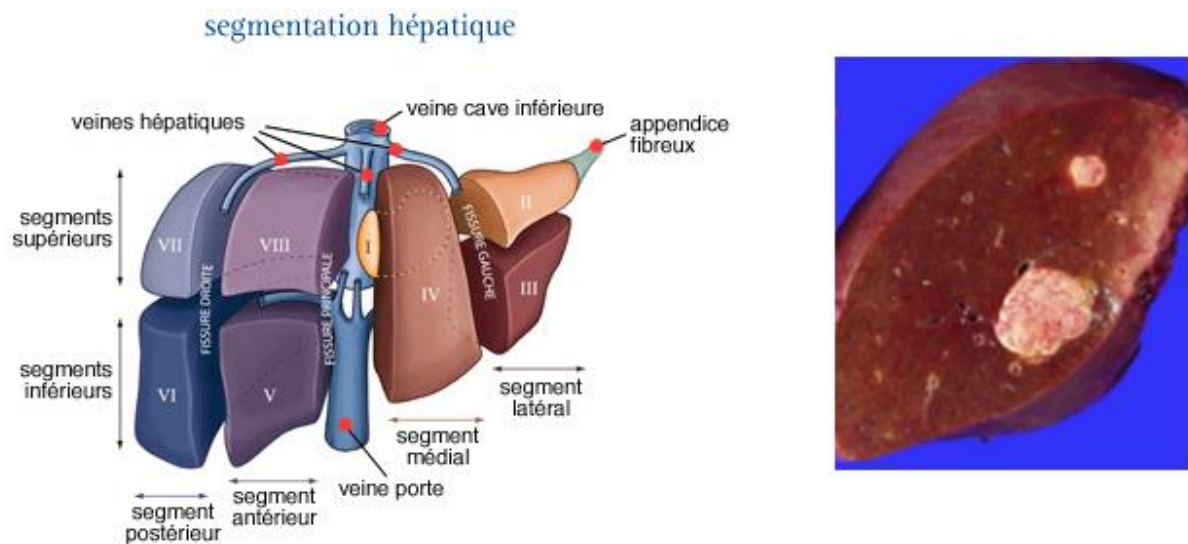


Figure n°7 Représentation schématique des segments hépatiques. Les 8 segments hépatiques ainsi que les vascularisations sont précisées sur le schéma. Clichés de MHCCR (Tamaoki et al., 2015) après hépatectomie droite (résection anatomique des segments hépatiques V, VI, VII et VIII).

Une marge de résection d'au moins 2 millimètres doit être respectée pour limiter la récurrence locale. La mortalité post-opératoire dans les services de chirurgie hépatobiliaire est inférieure à 4% dans les séries récentes. La morbidité présente une plus grande variabilité en fonction des séries, avec des complications observées (hémorragies, fistules, insuffisances hépatiques, etc) chez 18% à près de 40% des patients (Adam and Vibert, 2014). Dans le cas de métastases hépatiques synchrones, se pose la question de la séquence de résection de la tumeur primitive et des métastases hépatiques. La résection simultanée des deux sites atteints est faisable, cependant si le volume de foie à réséquer est trop important, une résection en

deux temps est préférable, auquel cas la priorité sera portée soit sur la chirurgie du primitif si il y a risque d'occlusion ou sur la chirurgie hépatique, du fait de la progression des métastases.

Après bilan d'imagerie, si une métastase a disparu suite au traitement par chimiothérapie, les recommandations exigent l'exérèse du site métastatique car le bilan histologique ne confirme que rarement la réponse complète de la métastase (dans plus de 80% des cas des cellules tumorales persistantes sont détectées par les anatomo-pathologistes). L'utilisation de la chirurgie hépatique permet à la survie médiane des patients de s'approcher des 50% à 5 ans post-opératoire, voire de les dépasser pour les patients ayant reçu des protocoles de chimiothérapies dits péri-opératoires (12 cures de chimiothérapies encadrant l'acte chirurgical) (Nordlinger et al., 2008).

Chimiothérapies conventionnelles

L'évolution majeure de la prise en charge thérapeutique des cancers colorectaux avancés et métastatiques est survenue dans les années 1950 avec l'utilisation des analogues de pyrimidines comme le 5-Fluorouracile (5FU), permettant de faire passer la médiane de survie globale des patients atteints de cancers colorectaux métastatiques de 6 mois sans chimiothérapie à 11 mois avec un traitement par 5FU (Scheithauer et al., 1993). Au niveau mécanistique, le 5FU, métabolisé par l'enzyme thymidine kinase en 5-fluorouracile monophosphate, bloque la synthèse et la réparation d'ADN par inhibition de l'enzyme Thymidilate Synthase (TS) (Longley et al., 2003).

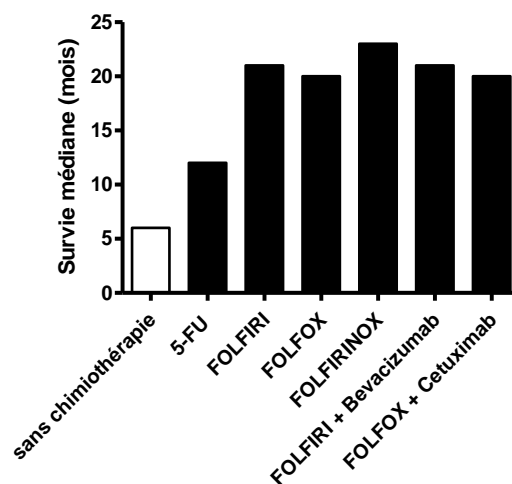


Figure n°8 : Comparaison des médianes de survie globale de patients atteints MHCCR en fonction des régimes de chimiothérapie utilisés. Schéma adapté de la publication (Gallagher and Kemeny, 2010).

Les protocoles de chimiothérapie en vigueur à l'heure actuelle consistent en un traitement par le 5FU en association avec différentes molécules de chimiothérapie comme l'Oxaliplatine, agent alkylant (protocole FOLFOX) ou encore l'Irinotecan, inhibiteur des topoisomérases (protocole FOLFIRI). Ces protocoles peuvent être administrés en adjuvant, après de la résection chirurgicale des métastases du CCR ou en péri-opératoire, avant et après l'opération. Pour les patients avec atteinte métastatique du foie, les options thérapeutiques vont dépendre du nombre et de la taille des métastases, l'objectif étant de pouvoir laisser un volume résiduel minimal de foie sain de 30 % du volume initial post-hépatectomie (Phelip et al., 2014). Malgré l'amélioration des paramètres de survie globale et de survie sans récurrence des patients bénéficiant d'une chimiothérapie adjuvante ou péri-opératoire, une grande majorité des patients présentant des MHCCR va récidiver dans les 3 ans post résection (plus de 60 % de patients avec récurrence pour le bras chimiothérapie péri-opératoire comparé aux 70 % de patients présentant une récurrence après chirurgie seule (Nordlinger et al., 2013). Se pose donc le problème de la persistance des cellules tumorales après chimiothérapie. Il n'est pas rare qu'un patient reçoive plusieurs hépatectomies pour cause de récurrence de son cancer et ce dans les 5 ans après la première exérèse chirurgicale (Wichert et al., 2013) ; sur une cohorte de plus de 1000 patients, près de 30% (n=288) ont reçu plus d'une hépatectomie (au moins deux, voire trois ou quatre résections sur 5 ans). Ces patients recevant plusieurs hépatectomies ont une survie globale meilleure comparée au groupe de patients ne recevant qu'une hépatectomie.

Biothérapies / thérapies ciblées

Les mécanismes impliqués dans l'angiogénèse sont connus comme participant au maintien des métastases ; l'apport des thérapies ciblées ou des biothérapies ciblant spécifiquement l'angiogénèse et la voie du VEGF/VEGF-R a été montré dans le cadre du CRC métastatique depuis les années 2000. Le Bevacizumab (Avastin) est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF empêchant sa fixation sur ses récepteurs, VEGFR-1 et VEGFR-2. Des protocoles d'essais cliniques ont démontré l'intérêt de l'utilisation de l'Avastin avec les régimes de chimiothérapies conventionnelles, qu'il s'agisse du FOLFOX (Giantonio et al., 2007) ou du FOLFIRI (Hurwitz et al., 2004). Ces deux études montrent une augmentation significative de la réponse des patients et une incidence nette sur la survie globale dans les groupes FOLFIRI/FOLFOX4 + Avastin (avec un *Hazard Ratio* sur la

mortalité des patients respectif de 0,66 et 0,75). Nous pouvons également citer deux autres anticorps antiangiogéniques : l'Aflibercept (anticorps « mimant » les récepteurs du VEGF) permettant de piéger le VEGF soluble montrant un intérêt sur la survie globale des patients en association avec le FOLFIRI ((Van Cutsem et al., 2012) HR sur la mortalité de 0,817) ainsi que le Ramucirumab (Cyramza), anticorps monoclonal ciblant le VEGFR-2 (Taberero et al., 2015) HR sur la mortalité 0,844 en association avec le protocole FOLFIRI).

Une autre grande famille d'anticorps monoclonaux servant dans le traitement du CCR métastatique consiste en la famille des anticorps anti-récepteurs à activité tyrosine kinase. Le Cetuximab (Erbix) et le Panitumumab (Vectibix) sont des anticorps monoclonaux ciblant le récepteur membranaire EGFR. L'utilisation des anti-EGFR est décrite comme permettant d'améliorer la survie globale de patients atteints de métastases hépatiques non résécables lorsque utilisé en combinaison avec les protocoles de chimiothérapie conventionnelle (Cunningham et al., 2004)(Ye et al., 2013).

En dehors des biothérapies, des inhibiteurs spécifiques ont été développés en oncologie et sont utilisés dans le cas du cancer colorectal métastatique. Le Regorafenib, inhibiteur de multiples kinases (VEGFR, B-Raf, PDGFR, etc) a été décrit dans l'essai clinique CORRECT comme augmentant la survie globale en monothérapie de patients atteints de métastases ne répondant plus aux chimiothérapies conventionnelles (6,4 pour le groupe ayant reçu le traitement vs 5 mois de survie médiane pour le groupe ayant reçu le placebo (Grothey et al., 2013)). On peut également citer les essais réalisés avec l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de la kinase B-Raf dont le gène présente une mutation sur le 600^{ème} codon, notamment le Vemurafenib, utilisé dans le traitement du mélanome métastatique où la substitution B-Raf^{V600E} est présente dans 50% des cas. Cependant les premiers résultats d'essais cliniques de phase II du Vemurafenib en monothérapie sur patients métastatiques ne montrent pas d'amélioration de la survie ; les auteurs n'excluent cependant pas que le Vemurafenib puisse avoir des effets en combinaison avec les chimiothérapies conventionnelles (Kopetz et al., 2015).

Concernant le rôle de l'immunothérapie dans la prise en charge du CCR, des données récentes de la littérature, issues d'essais cliniques de phase II tendent à montrer la pertinence du ciblage de l'axe PD1 et ses ligands PD-L1/PD-L2 pour les patients présentant des

mutations des enzymes de réparation de l'ADN. Le traitement des patients par l'anticorps monoclonal pembrolizumab (Keytruda) ciblant le récepteur PD1 sur une cohorte de 41 patients (Le et al., 2015) conduit à une réponse partielle principalement chez les patients MSI et non chez les patients présentant un système MMR fonctionnel.

Résistance à la chimiothérapie dans le traitement des MHCCR

Malgré la constante amélioration des thérapeutiques disponibles, la récurrence tumorale, surtout pour les patients avec maladie métastatique, est plus que commune. Nous allons détailler succinctement les résultats de l'essai de phase III promu par l'*European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC n°40983)* (Nordlinger et al., 2008)(Nordlinger et al., 2013), essai multicentrique dans 78 centres de chirurgies viscérales à travers le monde dont les inclusions ont démarré en 2000, comparant l'adjonction de chimiothérapie en péri-opératoire (12 cures de chimiothérapie par FOLFOX4 encadrant l'acte chirurgical) *versus* chirurgie seule pour des patients résécables d'emblée de leurs MHCCR (patients opérés précédemment de leur tumeur primitive ou opérable en simultanée avec les métastases).

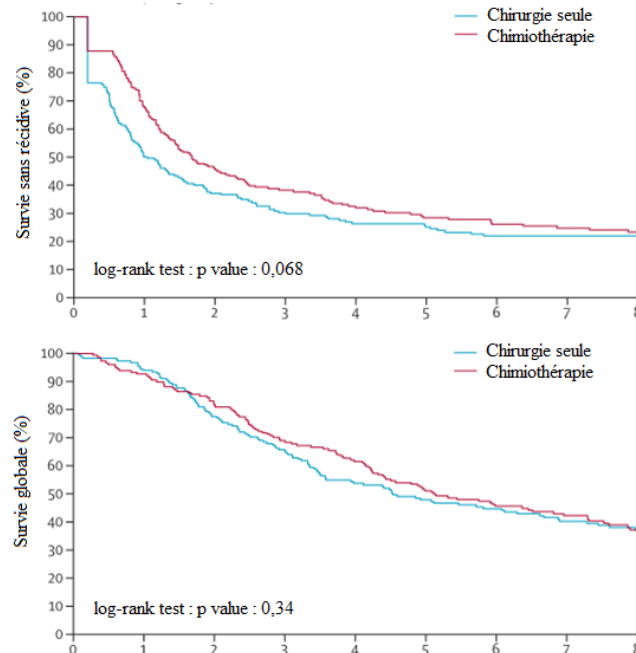


Figure n°9 : Survie sans récurrence et survie globale des patients de l'essai EORTC 40983 (Nordlinger et al., 2013). 364 patients, randomisés en deux groupes d'effectifs égaux ont reçus ou non un régime de chimiothérapie péri-opératoire pour le traitement de leurs MHCCR. Les données de survie globale et de survie sans récurrence, ainsi que les *p-value* des tests statistiques *log-rank* réalisés figurent sur le schéma.

Le résultat de l'étude précédemment citée est que la chimiothérapie conventionnelle en situation péri-opératoire n'induit qu'un ralentissement, significatif à court terme de la récurrence tumorale (36,1% de patients dans le bras chimiothérapie sans récurrence à 3 ans post-hépatomie vs 28,2% dans le bras chirurgie seul, HR : 0,77, p-value : 0,041 (Nordlinger et al., 2008)). Cette différence se perd sur un suivi plus long ; de plus, aucune différence de survie globale n'apparaît entre les deux groupes. De nouvelles données, issues d'un autre essai clinique porté par les mêmes équipes, visant à étudier les régimes de chimiothérapies type FOLFOX6, en association ou non avec thérapies ciblées anti-EGFR (Panitumumab) ou VEGF (Bevacizumab) pour patients résectables d'emblée de leurs MHCCR est en cours, les résultats étant attendus avant la fin d'année (enregistré sur www.clinicaltrials.gov sous le numéro NCT01508000).

Ces données cliniques, en adjuvant ou en péri-opératoire, nous indiquent que malgré une réponse partielle, des cellules tumorales résiduelles dans les sites secondaires vont être capables de survivre, d'échapper à la chimiothérapie et d'induire à plus ou moins long terme la récurrence de la pathologie. Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer cette situation.

Explication génétique et moléculaire de la résistance aux chimiothérapies

Plusieurs études conduites ont identifié des mécanismes génétiques pour expliquer la diminution, voire l'absence de réponse de certaines formes de CCR. Des travaux fondamentaux ont pu expliquer l'absence de réponse au 5FU des patients avec CCR MSI ; en effet, les mutations des enzymes de réparation de l'ADN conduisent à l'absence de reconnaissance de l'ADN modifié par traitement au 5FU (Tajima et al., 2004). De même, une étude de 2003 montre que les patients présentant une amplification du locus contenant le gène *TYMS*, gène codant la cible du 5FU, ceci induisant une diminution de la réponse à la molécule (Wang et al., 2004). Concernant les anti-EGFR, ces thérapies peuvent être utilisées si le patient ne présente pas de mutation du gène *KRAS* (plus de 30 % des patients présentent des mutations de l'exon 2), mutations rendant la tumeur insensible aux thérapies anti-EGFR. Ces patients ne bénéficient pas de l'avantage apporté par la biothérapie, voire ont une survie sans récurrence plus faible comparée à celle des patients *KRAS* sauvage (Lièvre et al., 2006)(Karapetis et al., 2008)(Lievre et al., 2008) pour le Cetuximab, (Douillard et al., 2010) pour le Panitumumab. Pour les patients n'arborant pas de mutation du gène *KRAS*, mais

présentant les mutations de *BRAF* (8-15 % des patients), *NRAS* (moins de 3% des patients) ou du gène de la PI3K (15% des patients), la réponse complète aux anti-EGFR est bien moindre comparativement aux patients ne présentant aucune de ces trois mutations (8% de réponse complète vs 38% (De Roock et al., 2010)).

Mécanismes cellulaires de résistance à la chimiothérapie

Depuis les travaux de Bonnet et Dick en 1997 (Bonnet and Dick, 1997), la théorie de cellules souches cancéreuses (CSC) vient contrebalancer le modèle stochastique, en proposant, comme pour le tissu sain, une hiérarchisation de la tumeur. Ainsi, une fraction minoritaire de cellules porterait le potentiel tumorigénique, de croissance et de renouvellement de la tumeur. Les marqueurs utilisés pour la caractérisation et l'isolement des CSC de CCR sont les protéines de surface CD24, CD44, CD133, CD166 et le marqueur Lgr5 (Dalerba et al., 2007)(Vermeulen et al., 2008). Ainsi, les fractions cellulaires isolées à partir de combinaisons de ces marqueurs possèdent une fonction tumorigénique *in vivo* beaucoup plus importante que le reste de la population cellulaire.

Des travaux se sont intéressés à étudier les variations du compartiment des CSC sous chimiothérapie dans le cadre du CCR. Des études conduites *in vivo* et *in vitro* ont pu montrer qu'un traitement chronique à la chimiothérapie conduit à l'enrichissement en cellules souches cancéreuses (Dylla et al., 2008)(Wilson et al., 2011)(Dallas et al., 2009); suggérant que les régimes de chimiothérapies conventionnelles sont incapables de tuer les cellules ayant les capacités de cellule souche. Dès lors, la recherche de molécules capables d'interférer avec les voies de signalisation impliquées dans le maintien des propriétés des CS est d'intérêt pour lutter contre la récurrence tumorale observée en clinique.

II Voie Hippo

Découverte de la voie Hippo

La recherche des gènes régulant l'homéostasie tissulaire et la taille des organes a conduit à la caractérisation du gène *Warts* chez la *Drosophile*. Celui-ci code pour une protéine kinase impliquée dans la régulation négative de la prolifération des tissus de la larve de la drosophile (Justice et al., 1995). D'autres gènes, codant pour les protéines adaptatrices *Sav*, *Mob* ainsi que la kinase *Hippo*, ont été isolés par différents travaux. Les drosophiles mutantes pour chacun de ces différents composants présentent un même phénotype, à savoir une hyperprolifération au sein des organes, identifiant ces protéines comme régulateurs négatifs de la croissance tissulaire (**Figure n°10**). L'effecteur terminal de cette augmentation de la prolifération cellulaire n'a été identifié que plus tardivement : la protéine *Yorkie* (Huang et al., 2005). La surexpression de *Yorkie* permet de récapituler le phénotype obtenu par la mutation de *Warts* ou de *Hippo*, avec augmentation de l'expression de régulateurs positifs de la prolifération. Au niveau mécanistique, l'activité de la kinase *Warts* associée avec la protéine modulatrice *Mats*, se traduit par l'interaction et la phosphorylation de *Yorkie*, conduisant à sa séquestration cytoplasmique. Lorsque *Warts* est inactivée, *Yorkie* va interagir dans le noyau avec le facteur de transcription *Scalloped* pour moduler la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération (Wu et al., 2008). Ces données ont permis de regrouper les données précédentes et de dessiner une voie de signalisation où l'activation en cascade des kinases *Hippo* puis *Warts* (associées à leurs protéines adaptatrices respectives) aboutit à l'inactivation de la protéine *Yorkie* et à l'inhibition de la prolifération cellulaire.

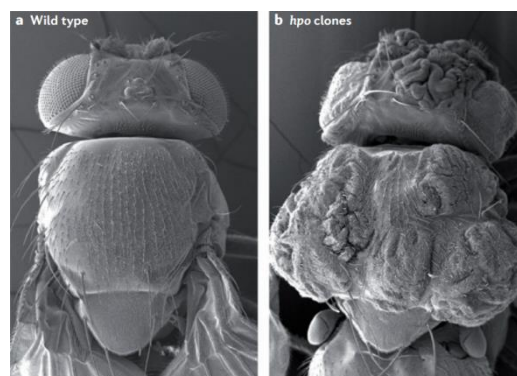


Figure n°10 : Comparaison des phénotypes de drosophiles sauvages (drosophile de gauche) ou mutées pour le gène *Hpo* codant la kinase *Hippo*. Clichés issus de la publication (Johnson and Halder, 2014).

L'inhibition de Yorkie médiée par Warts est grandement dépendante de sa phosphorylation sur le résidu Sérine S168; des drosophiles exprimant le transgène non phosphorylable Yorkie^{S168A} vont être insensibles à l'inhibition de prolifération médiée par la voie Hippo (Dong et al., 2007). Des études d'homologies ont permis d'identifier cette voie de signalisation chez les mammifères ; Mst1/Mst2 sont les kinases homologues de Hippo, LATS1/LATS2 de Warts. Mob est l'homologue de Mats et Sav1, le pendant de Sav. Chez les mammifères, la fonction de régulateur transcriptionnel de Yorkie est assurée par deux coactivateurs transcriptionnels, les protéines YAP et TAZ, et la fonction du facteur de transcription Scalloped est portée par les 4 membres de la famille TEAD.

Ainsi, la voie de signalisation Hippo est une voie de signalisation conservée parmi les espèces ; des études phylogénétiques ont pu démontrer la présence de gènes codants pour YAP et ses orthologues sur l'ensemble du règne des métazoaires (exception notable pour *C. Elegans*, qui n'exprime pas YAP) depuis les organismes les plus simples tels que *Nematostella vectensis* (45% d'homologie entre sa séquence et le YAP humain). L'expression de TAZ ne se retrouve que chez les vertébrés ; *WWTR1*, le gène codant TAZ, serait issu d'une duplication du gène *YAPI*, événement remontant à plus de 500 millions d'années (Hilman and Gat, 2011).

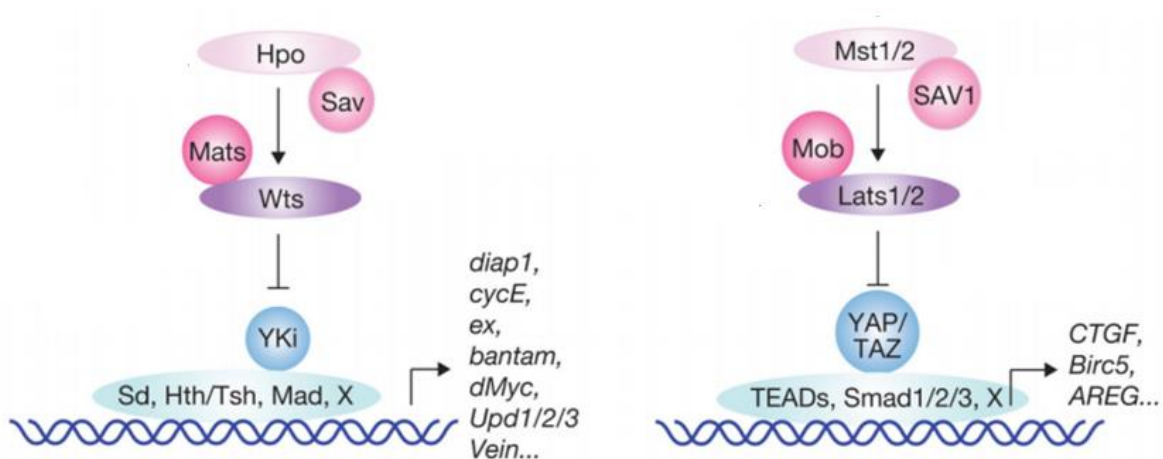


Figure n°11: Schéma comparatif des voies de signalisation Hippo chez la drosophile (partie gauche) et chez les mammifères (droite) (Zhao et al., 2010a). Le coeur de la voie de signalisation consiste en cette cascade de kinases Mst1/Mst2 *Mammalian Sterile20-like kinase 1/2* (Hippo chez la drosophile) activant par phosphorylation les kinases *Large Tumor Suppressor 1/2* LATS1/2 (Wts) qui vont phosphoryler et inhiber à leur tour les protéines YAP et TAZ (Yorkie). Lorsqu'elles sont hypophosphorylées, YAP et TAZ (Yorkie) peuvent former des complexes protéiques préférentiellement avec les facteurs de transcription TEAD (Scalloped) pour induire la transcription de gènes pro-prolifératifs, pro-invasifs, etc.

YAP/TAZ : Les effecteurs terminaux de la voie Hippo

La protéine YAP a été identifiée et caractérisée en 1995 comme interagissant avec la Src kinase c-Yes *via* son domaine d'interaction SH3 (Sudol, 1995), d'où son acronyme (*Yes Associated Protein*). TAZ quant à elle a été identifiée en 2000 comme protéine interagissant avec la protéine 14-3-3 et possédant un domaine d'interaction au motif de type PDZ (du nom des trois premières protéines caractérisées possédant ce domaine, PSD95, Dsg, ZO-1) (Kanai et al., 2000). Ces deux protéines, issues de la transcription de deux gènes distincts (situé en 11q22 pour le gène *YAP1* et en 3q25 pour le gène *WWTR1*) présentent une homologie de séquence de 46 % entre elles. Des domaines protéiques communs sont retrouvés : le domaine d'interaction avec les facteurs de transcription de la famille TEAD situé en N-terminal de YAP et TAZ, la présence d'au moins un domaine d'interaction de type WW (domaine protéique d'une quarantaine de résidus contenant deux tryptophanes, interagissant avec le motif PPxY présent chez de nombreuses autres protéines), le domaine transactivateur (TAD) en C-Terminal ainsi que le domaine d'interaction avec les protéines exprimant des domaines de type PDZ (Hong, 2013).

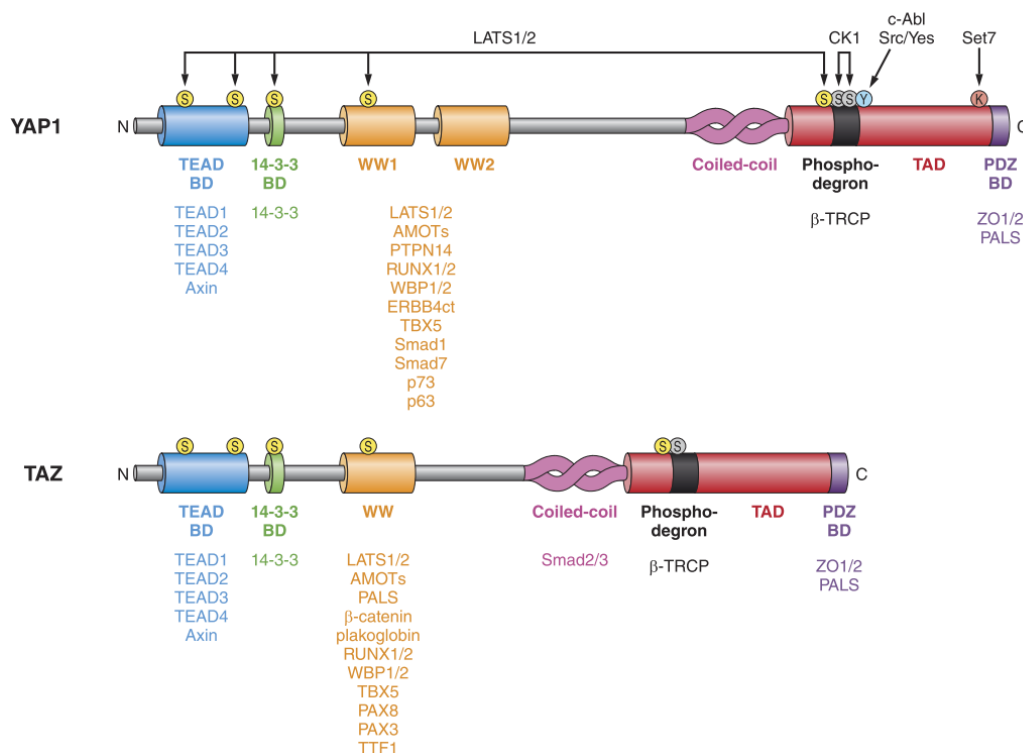


Figure n°12 : Comparaison des domaines protéiques de YAP et TAZ, schéma issu de la revue (Piccolo et al., 2014). Les principales interactions connues, modifications post-traductionnelles, ainsi que les enzymes catalysant ces modifications sont précisées au-dessus de YAP et de TAZ.

Le rôle de transactivateur transcriptionnel des deux acteurs n'a été caractérisé que plusieurs années après leur découverte. Cette fonction de régulateur transcriptionnel (Kanai et al., 2000)(Yagi et al., 1999) est dépendante du domaine C-terminal, puisque des constructions déficientes pour cette partie de YAP et TAZ perdaient l'activité de trans-activateur transcriptionnel.

Modèles mammifères sur la voie Hippo

L'identification de Yorkie (Yki), orthologue de YAP (31 % d'homologie entre les deux protéines) en 2005, interagissant avec Warts a permis de faire le lien entre la voie Hippo et la régulation transcriptionnelle sous-jacente. La surexpression forcée de Yki chez la drosophile conduit à une hyperprolifération des tissus, les cellules ayant un temps de doublement de population 3 fois plus court que les drosophiles *wild-type* (Huang et al., 2005), observation qui peut être mise en parallèle de l'étude précédente (toujours chez la drosophile) identifiant la kinase Hippo en 2002 comme un régulateur majeur de la taille des organes (Wu et al., 2003). L'analyse du rôle des orthologues de Yki, YAP et de TAZ, chez les mammifères a pu être réalisée par diverses stratégies ; d'une part en invalidant les gènes faisant partie de la cascade Hippo, soit en induisant la synthèse *in situ* de formes constitutivement actives de YAP ou TAZ.

Les effecteurs terminaux de la voie de signalisation Hippo ont un rôle prépondérant lors de l'embryogénèse. En effet, l'invalidation homozygote de YAP engendre la mort des embryons dès le 8,5^{ème} jour de développement (Morin-kensicki et al., 2006) alors que la perte d'expression de TAZ (Hossain et al., 2007) (Makita et al., 2008) conduit à de sévères malformations *in utero* (malformations des glomérules rénaux, pathologie pulmonaire similaire à de l'emphysème) avec augmentation de la mortalité des souriceaux. Il est intéressant de relever que les modèles murins *ko* pour TEAD1/2 présentent un phénotype comparable à celui des souris YAP *ko* (Sawada et al., 2008) avec apparition de malformations et augmentation de la mortalité *in utero* dès E 9,5. Ces données *in vivo* confortent le rôle prépondérant des effecteurs terminaux de la voie Hippo dans le développement des embryons et dans l'organogénèse.

Au niveau hépatique, la surexpression du dominant constitutif de YAP (substitution de la Sérine en position 127 par une Alanine) conduit à une augmentation de la prolifération des hépatocytes et à une hépatomégalie associée à l'augmentation du pourcentage de cellules

Ki67 positives dans le parenchyme hépatique (Camargo et al., 2007). Les modèles murins mutés pour *Mst1* ou *Mst2* (fond génétique des animaux *Mst1*^{+/-} *Mst2*^{-/-} ou *Mst1*^{-/-} et *Mst2*^{+/-}, le double *ko* étant létal lors de l'embryogénèse des souris) présentent également une hypertrophie du foie, ainsi que des stades avancés de carcinome hépatocellulaire pour une forte proportion des animaux. L'invalidation conditionnelle de *Mst2* dans le foie conduit à la prolifération accrue des hépatocytes quiescents, à la surexpression des protéines associées à la transition G0-G1/S telles que la cycline E ou PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigene*). La perte de *Mst2* est associée à la diminution du niveau de phosphorylation de YAP et à l'augmentation de son activité transcriptionnelle, avec augmentation de la transcription du CTGF et ce jusqu'à stade du carcinome hépatocellulaire. Les effets sur la prolifération sont médiés par YAP puisque son invalidation conduit à la perte d'expression de la cycline E ou de c-Myc (Zhou et al., 2009).

Un modèle murin de surexpression de YAP spécifiquement dans le foie a été également utilisé pour permettre de montrer le rôle crucial de TEAD (notamment TEAD-2) dans les propriétés pro prolifératives et pro cancéreuses des effecteurs de la voie Hippo. En effet, le croisement de ce modèle avec des souris exprimant de manière inductible un dominant négatif de TEAD-2 dans le foie a montré une réversibilité de l'hyper prolifération et du développement de carcinomes hépatocellulaires chez les souris exprimant YAP et le dominant négatif de TEAD-2. (Liu-Chittenden et al., 2012).

Dans le tractus digestif, un modèle de surexpression de YAP, inductible à la doxycycline, conduit à la prolifération accrue des cellules souches intestinales ainsi qu'à la perte de la différenciation le long de l'axe crypto-villositaire. Cet effet s'estompe lorsque les animaux ne reçoivent plus de doxycycline (Camargo et al., 2007). Chez les souris, l'invalidation des kinases *Mst1* ou *Mst2* au niveau de l'intestin et du côlon reproduit ces altérations avec apparition de dysplasie le long de l'intestin grêle et du côlon, augmentation de la prolifération des cellules progénitrices dans les cryptes intestinales et coliques et perte de différenciation dans les sous types entérocytaires ou caliciformes (Zhou et al., 2011). Un modèle récent d'inhibition *in situ* par siRNA de YAP et de TAZ a été réalisé dans l'intestin ; les auteurs ont pu également observer la perte de prolifération dans la base de la crypte intestinale et un défaut de différenciation, principalement des cellules caliciformes. A noter que ces propriétés de prolifération des progéniteurs est dépendante de TEAD4, puisque la transfection d'un dominant négatif de TEAD conduit à la diminution du nombre de cellules

souches intestinales Lgr5+. L'approche inverse avec inhibition soit de LATS1/LATS2 ou Mst1/Mst2 conduit au phénotype opposé dans ce même modèle (Imajo et al., 2015).

Dans des modèles de régénération du tissu intestinal induit après un traitement au dextran sulfate de sodium (DSS), la régénération tissulaire de la muqueuse colique, observée 4 jours après arrêt du traitement est associée à l'expression soutenue de YAP, suggérant sa participation dans ces mécanismes de restauration de l'organe. Or, la régénération tissulaire est altérée chez les modèles conditionnels de déficience de YAP dans l'intestin et le côlon, entraînant la mort des souris. A l'inverse, la sur-activation de YAP après traitement au DSS dans des modèles de souris invalidées pour la protéine adaptatrice Sav1 induit à la formation de polypes, nous indiquant bien de la nécessité d'une régulation fine de l'activation des protéines YAP/TAZ (Cai et al., 2010); un modèle murin encore plus précis de perte d'expression conditionnelle de YAP dans les cellules souches Lgr5 positives de l'intestin et du côlon conforte ces données sur l'implication cruciale de YAP dans la régénération tissulaire suite à un traitement au DSS, *via* notamment la production des ligands des récepteurs de la famille Erbb (Gregorieff et al., 2015).

Ainsi, l'analyse des données sur modèles murins tend à prouver le rôle essentiel de YAP et de TAZ dans l'homéostasie tissulaire mais également dans l'initiation de stades précoces de cancers de la sphère digestive (carcinomes hépatocellulaires, adénomes coliques).

Interactome des protéines YAP et TAZ

Au vu de l'importance des rôles biologiques de YAP et TAZ, des études ont étudié les protéines capables d'interagir physiquement avec ces deux co-activateurs transcriptionnels. En 2013 et 2014, 3 études ont été réalisées pour identifier les protéines interagissant avec la cascade de signalisation Hippo, une chez la Drosophile (Kwon et al., 2013) et deux dans des modèles de cellules de mammifères (Couzens et al., 2013), (Wang et al., 2014a).

Ces études ont identifié par spectrométrie de masse après immunoprécipitation de composants de la voie Hippo (Mst1/2, etc) respectivement 143 protéines chez la drosophile et plus de 300 protéines pour les études chez les cellules de mammifères interagissant avec. Ces études ont pu confirmer à grande échelle l'interaction entre YAP et TAZ et les membres de la famille TEAD, ainsi que bon nombre d'interactions via les domaines WW tout en identifiant de nouvelles protéines capables d'interagir avec ces co-activateurs. On peut citer le cas de la

protéine CCDC85C (Wang et al., 2014a) identifiée et capable de moduler la localisation subcellulaire de YAP par sa séquestration cytoplasmique après surexpression dans un modèle de cancer du sein.

Parmi les protéines interagissant avec YAP et TAZ, on peut distinguer les facteurs de transcription interagissant dans le noyau avec YAP/TAZ pour permettre la transcription de nombreux gènes cibles en fonction des partenaires recrutés et les protéines autres que facteurs de transcription. Parmi les principaux facteurs de transcription retrouvés, les facteurs de transcription Smad (Smad 1, 2 et 3) ainsi que les 4 membres de la famille TEAD sont des facteurs de transcription essentiels dans les fonctions biologiques dépendantes de YAP et TAZ. Concernant les protéines n'ayant pas un rôle de facteur de transcription, on peut séparer les protéines contribuant à la transcription (β -Caténine, p300) des protéines participant au contrôle de la localisation subcellulaire de YAP/TAZ. YAP/TAZ peuvent interagir avec des protéines constituant les jonctions serrées (AMOT, AMOT-L1 et AMOT-L2, ZO1 ZO2, etc). Ces interactions vont également constituer un moyen de régulation de l'activité de YAP/TAZ, dépendamment ou indépendamment de la cascade de kinases de la voie Hippo.

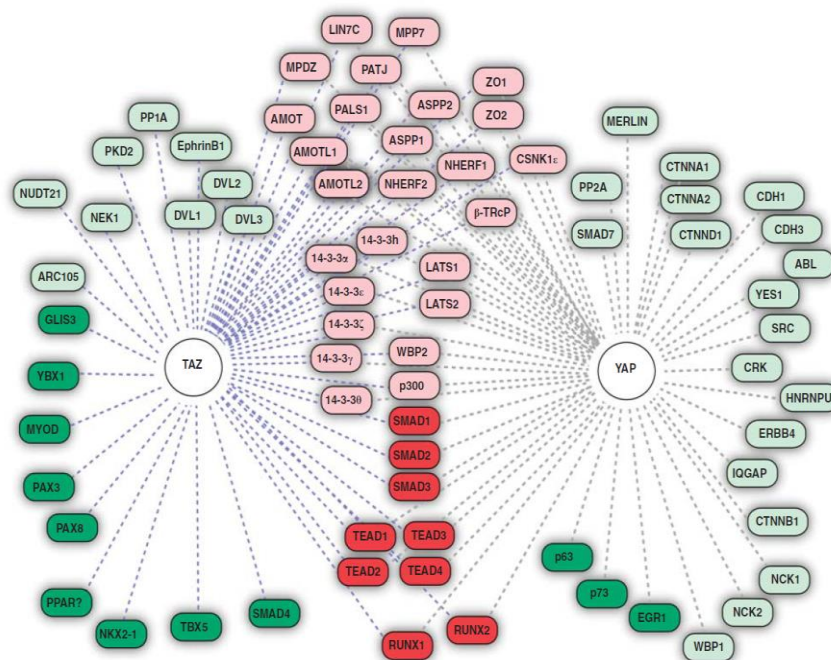


Figure n°13 : Représentation des interactions communes ou spécifiques des protéines YAP et TAZ (Mauviel et al., 2012). Sont représentées en rouge et en vert foncé les facteurs de transcription respectivement communs à YAP et TAZ ou spécifique de l'un et l'autre. En rose et vert clair sont représentées les protéines autres que les facteurs de transcription : protéines kinases (SRC, YES1), les phosphatases (PP2A), les protéines des jonctions serrées (ZO1/2, AMOT, etc) communes à YAP et TAZ ou décrites comme interagissant avec YAP ou TAZ.

Description de l'interaction entre YAP/TAZ et TEAD

Les protéines de la famille TEAD (facteurs de transcription contenant un domaine d'interaction à l'ADN TEA) sont les facteurs de transcription les plus décrits dans la littérature comme partenaires de YAP/TAZ, via leur domaine TEAD en N-terminal. Il existe 4 gènes différents dont la transcription et la traduction aboutit à la synthèse des 4 protéines TEAD (1 à 4). Le domaine d'interaction de TEAD pour YAP en C-terminal est bien conservé entre les 4 facteurs de transcription TEAD (entre 79 et 91% d'homologie entre le C-terminal de TEAD2 et les autres domaines de TEAD1, 3 et 4) et YAP a été décrit comme interagissant avec les 4 facteurs de transcription (Vassilev et al., 2001).

Des études de *GST-pull down* ont permis de montrer que le fragment peptidique de YAP comprenant les AA 50 à 100 interagissait avec TEAD1 ; des études de mutagenèse ont démontré le rôle prépondérant des AA 94 et 95 de YAP dans la reconnaissance avec la partie C-terminale de TEAD. Il est décrit dans l'atrophie péri-papillaire de Sveinsson que la substitution de l'AA 406 de TEAD1 (TEAD1^{Y406H}), une mutation causale décrite dans 100% des cas de la pathologie (Fossdal et al., 2004), conduit à la perte d'interaction avec YAP (Kitagawa, 2007).

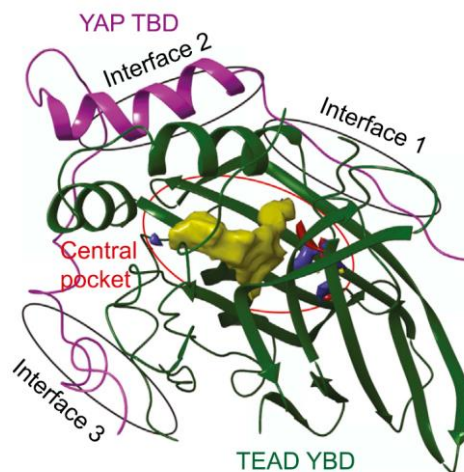


Figure n°14 : Modélisation de l'interaction entre le co-activateur transcriptionnel YAP et le facteur de transcription TEAD (Pobbati et al., 2015). (YAP-TBD: *YAP-TEAD Binding Domain* / TEAD YBD : *TEAD-YAP Binding Domain*).

Le complexe entre YAP et TEAD1 a été cristallisé en 2010 par Li et collaborateurs (Li et al., 2010); schématiquement, le domaine d'interaction à TEAD de YAP (*YAP-TBD*) en N-terminal va encadrer le domaine C-terminal de TEAD (*TEAD-YBD*), créant 3 interfaces de

contact (de 1 à 3). Les liaisons importantes pour l'interaction entre les deux partenaires se trouvent sur la troisième interface qui va s'insérer dans la poche formée par TEAD. Au niveau physique, les ponts hydrogènes entre l'Arginine en position 89 de YAP et l'Acide Aspartique 249 de TEAD1, ainsi que ceux formés entre la Sérine 94 de YAP et la Tyrosine 406 et l'Acide Glutamique 240 de TEAD1 sont majeurs dans la stabilisation du complexe ; des mutations des AA 89 ou 94 dans l'interface 3 de YAP abrogent l'interaction des complexes YAP/TEAD, ainsi que l'activité et la transcription de gènes cibles décrits (comme les protéines Cyr61 et CTGF).

Concernant l'interaction physique entre TEAD et TAZ, la structure cristallographique du complexe n'est pas encore connue et publiée. En revanche, des études d'interactions par résonance plasmonique de surface montrent que les fragments N-terminaux de YAP (YAP50-171) et de TAZ (TAZ13-124) ont des constantes de dissociation du même ordre de grandeur avec TEAD4 (Hau et al., 2013), suggérant un mécanisme d'interaction semblable entre les complexes YAP/TEAD et TAZ/TEAD.

Gènes cibles de YAP/TAZ

Etant donné le rôle de YAP/TAZ dans la régulation et la transcription génique, des études transcriptomiques ou de *ChiP-sequencing* ont été réalisées (Zanconato et al., 2015) (Lian et al., 2010) pour identifier les promoteurs et les gènes ciblés par YAP/TAZ. Ces analyses ont été réalisées sur des modèles cellulaires non transformés ou sur lignées cancéreuses.

L'analyse par *ChiP-seq* est réalisée sur des cellules MDA-MB 231, exprimant YAP et TAZ et étant déficiente pour *NF2*. Les auteurs ont comparé les *reads* séquencés après immuno-précipitation des complexes protéines-ADN avec des anticorps anti-YAP (près de 8 000 *reads*) ou anti-TAZ (plus de 9000 *reads* séquencés). La mise en commun des deux jeux de données a montré une très forte redondance dans les séquences immunoprécipitées par les deux anticorps ; en effet, plus de 87 % de *reads* sont communs entre les deux stratégies expérimentales. Ces données nous indiquent donc, pour une lignée cancéreuse particulière, que YAP et TAZ ont une forte redondance de localisation et de fixation sur leurs gènes cibles.

Les auteurs retrouvaient ainsi des transcrits caractéristiques de l'activité de YAP/TAZ correspondant aux protéines matricielles Cyr61 et CTGF, au récepteur à activité tyrosine

kinase AXL, mais également au facteur de transcription c-Myc. Le *ChIP-seq via IP* par un anticorps anti-TEAD4 (8400 *reads*) présente plus de 72% de *reads* communs avec le *ChIP-seq* de YAP et TAZ, permettant de renforcer le modèle où la majorité des gènes régulés par YAP/TAZ le sont *via* les facteurs de transcription de la famille TEAD. Une stratégie similaire (Lian et al., 2010) s'est intéressée à comparer l'occupation de YAP sur les promoteurs de gènes en fonction de l'état de différenciation de cellules souches embryonnaires ; les auteurs ont pu constater lors de la différenciation induite par changement de milieu de culture que le nombre de *reads* obtenus après immuno précipitation par anticorps anti-YAP passe de 14 000 à environ 5 000, la présence de YAP se perdant sur les promoteurs de gènes de pluripotence, tel *Oct4*.

Une étude de *ChIP-on-chip* a été également réalisée après IP de YAP et TAZ dans le tissu sain intestinal murin (Imajo et al., 2015) et montre la colocalisation de ces effecteurs avec le facteur de transcription Klf4, facteur de transcription important dans la différenciation intestinale vers les cellules caliciformes. Une étude récente transcriptomique (Cox et al., 2016) comparant les foies de poissons zèbres surexprimant le transgène YAP^{S87A} (équivalent du YAP^{S127A} humain) aux poissons zèbres contrôles montre une surexpression de transcrits, dont plus de 30% sont impliqués dans des processus métaboliques (transports d'acides aminés, de lipides, etc).

Ainsi, les analyses globales démontrent qu'un large panel de gènes, impliqués dans différents mécanismes cellulaires sont sous la dépendance des protéines YAP et TAZ, complexés ou non avec les facteurs de transcription TEAD.

Régulation transcriptionnelle de YAP et TAZ

Les ARN messagers de YAP (Gaffney et al., 2012) et TAZ sont détectés à l'état physiologique dans un large panel d'organes et de types cellulaires (Kanai et al., 2000), à l'exception des leucocytes. Toutefois, les mécanismes de transcription de ces deux gènes sont assez peu détaillés. Quelques publications dans différents modèles (physiologiques ou pathologiques) décrivent des mécanismes de régulation transcriptionnelle de YAP et TAZ ; en ce qui concerne les mécanismes d'épissage ils sont également peu connus pour les deux co-activateurs.

Organisation génique de YAP et régulation transcriptionnelle

Une étude de 2012 montre l'existence de 8 isoformes du gène de YAP1, nommé de YAP1-1 α à YAP1-1 δ et YAP1-2 α à YAP1-2 δ (les 4 isoformes YAP1-1 ne présentent qu'un domaine WW, les 4 isoformes YAP1-2 deux). Par la suite, nous n'évoquerons que les différences globales entre YAP1-1 et YAP1-2. Les protéines issues de l'épissage alternatif font entre 450 AA (YAP1-1 α) et 508 AA (YAP1-2 δ).

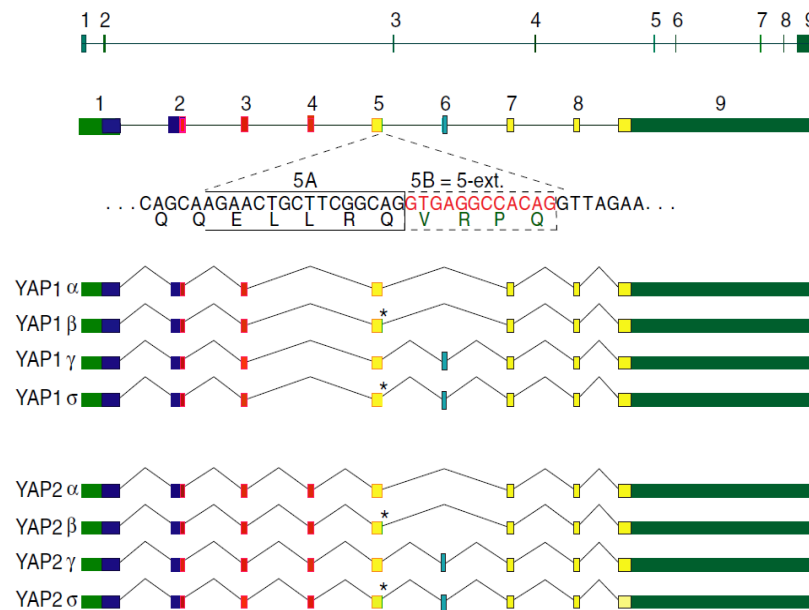


Figure n°15 : Représentation schématique du gène YAP1 et de ses 8 isoformes (Gaffney et al., 2012). Le gène YAP1 comprend 9 exons. Le premier domaine WW est contenu dans les exons 2 et 3. La séquence du second domaine WW est contenu dans l'exon 4, épissé ou non, permettant de distinguer les deux familles d'isoformes de YAP1, YAP1-1 et YAP1-2. Les astérisques au-dessus de l'exon 5 de 4 isoformes représentent une extension de 4 acides aminés de séquence VRPQ dans cet exon.

Au niveau fonctionnel, peu d'études se sont intéressées aux différences fonctionnelles induites par ces différentes isoformes de YAP1, les rares étant le fruit des travaux du groupe de Marius Sudol, chercheur ayant caractérisé YAP. En effet, il est décrit que *via* ses domaines WW, YAP peut interagir avec la queue cytoplasmique du récepteur à activité tyrosine kinase ErbB4 ; cette étude a montré que les isoformes à deux domaines WW interagissent plus fortement avec la queue cytoplasmique d'ErbB4 et que les complexes ErbB4/YAP1-2 possèdent une activité trans-activatrice plus importante que les complexes ErbB4/YAP1-1 (Komuro et al., 2003). Le même groupe a montré que les fonctions pro-apoptotiques de YAP

sous divers stress, mettant en jeu son interaction avec p73, dépendent également de l'isoforme YAP1-2 (Oka et al., 2008).

Au niveau de son expression génique, *YAP1* peut-être transcrit par le facteur de transcription CREB, ce mécanisme étant décrit dans le rein ainsi que dans le carcinome hépatocellulaire (Wang et al., 2013a) (Chen and Harris, 2015) ; dans le cas des carcinomes hépatocellulaires développés sur fond d'infection par le virus de l'hépatite B, il est décrit que la protéine virale HBx induit la fixation de CREB sur le promoteur de YAP (Zhang et al., 2012). Dans la lignée cancéreuse colique HCT116, la fixation de TCF4/ β -Caténine dans le premier intron du gène de YAP conduit à la transcription de ce dernier, renforçant la complexité des liens unissant la voie *Wnt* aux effecteurs terminaux de la voie Hippo (Konsavage et al., 2012). Par expérience de *Chip-sequencing*, le facteur de transcription ERG est identifié comme se fixant sur le promoteur de YAP1 et permet la transcription dans des modèles de cancers de la prostate (Nguyen et al., 2015).

Organisation génique de TAZ et régulation transcriptionnelle

Le gène *WWTR1* (*WW domain containing transcription regulator 1*) contient 7 exons de taille variable (entre 100 et près de 4000 pb) et code la protéine TAZ, d'une longueur de 400 AA. A l'heure actuelle, aucun travail n'est publié sur l'existence d'isoformes de TAZ ; 3 séquences d'ARNm différentes sont accessibles sur le site du *NCBI*, cependant aucune différence n'est observée en alignant les séquences codantes.

Concernant la régulation transcriptionnelle de *WWTR1*, le gène est transcrit par HIF-1 α en condition hypoxique ; le facteur de transcription HIF-1 α (Xiang et al., 2014) a été décrit comme induisant la transcription de *WWTR1* en se fixant sur un élément de réponse HRE situé entre les exons 2 et 3. A l'inverse, le répresseur transcriptionnel ZBED6 conduit dans les lignées coliques HCT116 et RKO à éteindre l'expression de TAZ (Akhtar Ali et al., 2015).

Régulation de YAP/TAZ par les miARNs

Les microARNs (miARNs) régulent l'expression génique par dégradation de leur cible ou blocage de la traduction ; en fonction de la cible et de l'action biologique induite, on parlera d'oncomirs ou de miARNs suppresseurs de tumeurs pour les miARNs favorisant ou

inhibant la progression tumorale. Dans la littérature, les transcrits la voie Hippo, de *YAP1* et *WWTR1* sont décrits comme étant la cible de nombreux miARNs.

Concernant un rôle suppresseur de tumeur, une publication dans le cancer de l'ovaire montre le rôle du mir129-5p dans la régulation négative à la fois de YAP et de TAZ par fixation sur leurs 3' *UTR*, aboutissant à un ralentissement de la prolifération cellulaire (Tan et al., 2015). A l'inverse, les oncomirs 135b (Hua et al., 2016) et 181c (Chen et al., 2015) sont décrits comme régulant négativement l'expression des membres de la voie Hippo, induisant l'activation de YAP et TAZ. La ré-analyse de données GEO de l'étude d'expression de microARNs dans le CCR a permis de voir l'augmentation d'expression du mir-135b dans les adénocarcinomes coliques par rapport à la muqueuse saine (voir figure ci-dessous).

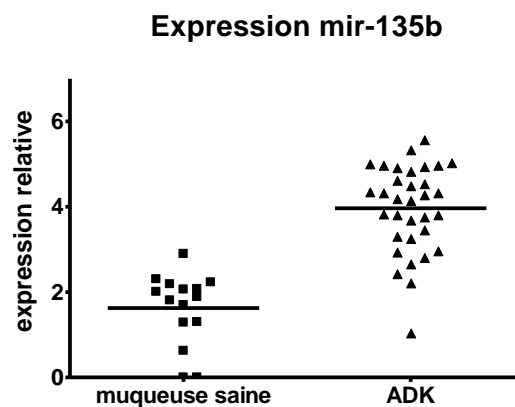


Figure n°16 : Expression du mir-135b dans des adénocarcinomes coliques et du côlon non tumoral. Les données brutes sont accessibles sur l'onglet *GEOdataprofiles* du site du *NCBI*. Les données analysées comparent l'expression des miARNs par hybridation sur les puces Agilent Human miRNA Microarray (V3), 8x15K dans 15 prélèvements sains (muqueuse saine) et 33 adénocarcinomes (ADK). L'expression du mir-135b est significativement plus élevée dans les ADK du côlon que dans la muqueuse saine (p value < 0.0001, Mann-Whitney).

Modifications post-traductionnelles et régulation de la localisation subcellulaire de YAP/TAZ

La localisation de YAP et TAZ varie suivant les stimuli, le type cellulaire ou les stress appliqués aux cellules. Il est intéressant de noter que les mécanismes exacts conditionnant l'import et l'export nucléaire de ces protéines n'est pas connu, les deux protéines ne possédant pas de séquence de type NLS (*Nuclear Localization Signal*). La localisation, la fonction et la dégradation de YAP et TAZ sont dépendantes des modifications post traductionnelles pouvant être apportées ou enlevées par différentes enzymes, qu'il s'agisse de kinases, de lysine

méthyl-transférases, *etc.* La voie de signalisation « canonique » aboutissant à l'inhibition de YAP et TAZ est la voie de signalisation Hippo, activée sous divers stimuli.

Mécanismes d'activation de la voie Hippo

La cascade de kinases de la voie Hippo va s'activer et aboutir au mécanisme final d'inhibition des protéines YAP/TAZ par phosphorylation. Les principales marques inhibitrices de YAP/TAZ sont les phosphorylations de résidus sérine (Zhao et al., 2007) (Lei et al., 2008) catalysés par les kinases LATS1/LATS2 (5 résidus phosphorylables sur YAP, 4 sur TAZ, cf **Figure n°12**). Les constructions mutées pour ces résidus sérine particuliers (substitution des 5 et 4 sérines par des alanines respectivement pour YAP et TAZ, formes mutées dites YAP^{S5A} ou TAZ^{S4A}) présentent une insensibilité vis-à-vis de la voie Hippo et une plus forte activité transcriptionnelle et oncogénique. Au sein de ces différents résidus, les sites primordiaux quant à l'inhibition de YAP et TAZ sont le résidu S127 de YAP (S89 pour TAZ) et S381 (S311 pour TAZ). Lorsque YAP et TAZ sont hyperphosphorylés sur ces résidus sérines, les coactivateurs se trouvent séquestrés dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3 et/ou dégradés. Au niveau des mécanismes de déphosphorylation, la Protéine Phosphatase 1 est décrite comme permettant la déphosphorylation directe de YAP sur son résidu S127 (Royer et al., 2014), ou indirecte pour YAP et TAZ *via* déphosphorylation et inhibition de LATS1 sur le résidu S909 (Lv et al., 2015).

L'exemple le mieux décrit de régulation de YAP/TAZ est le rôle de la protéine Merlin, codée par le gène *NF2*. Cette protéine membranaire (retrouvée parmi les protéines des jonctions serrées) est capable d'activer la voie Hippo, aboutissant à l'hyperphosphorylation de YAP et de TAZ par activation des kinases MST1/MST2. Les personnes présentant des mutations du gène *NF2* (fréquence de 1/30 000) et les modèles murins déficients en *NF2* ont une susceptibilité accrue à développer des tumeurs. De plus, *NF2* est couramment retrouvé muté dans de nombreuses tumeurs (schwanomes, méningiomes, etc). La restauration de *NF2* dans des modèles cellulaires déficients en Merlin inhibe l'activité transcriptionnelle médiée par YAP/TAZ, et ce de manière LATS dépendante, validant le rôle de *NF2* dans l'activation de la voie Hippo et l'inhibition de ses effecteurs (Aragona et al., 2013). Cependant, si les mécanismes d'action de *NF2* sont décrits, les mécanismes induisant l'activité de *NF2* sont encore mal compris.

Le gène suppresseur de tumeurs *RASSF1A* (*Ras association domain family 1 isoform A*), dont le promoteur est retrouvé hyperméthylé dans de nombreux cancers, participe également à l'activation de la voie Hippo. En effet, la protéine RASSF1A est décrite comme interagissant avec les protéines kinases MST1/2, stabilisant l'expression de MST2 et activant l'autophosphorylation de MST1/2 (Guo et al., 2007). Les mêmes auteurs ont montré que les complexes formés par MST1/2 avec RASSF1A vont diminuer la déphosphorylation de ces kinases, ralentissant l'inactivation de la voie Hippo (Guo et al., 2011). Des travaux récents ont également identifié une régulation négative de RASSF1A sur YAP *via* l'activation de la GTPase RhoB dans les cancers du poumon, activation inhibant la localisation nucléaire de YAP (Dubois et al., 2016) ou par inhibition du contact entre les facteurs de transcription SMAD et YAP (Pefani et al., 2016).

Mécanismes de régulation indépendants de la voie Hippo

Les phosphorylations apportées sur les sérines de YAP et TAZ par LATS1/2 sont les modifications post-traductionnelles les mieux caractérisées ; une phosphorylation activatrice peut être apportée sur une tyrosine par la Src kinase YES1 en position Y357 de YAP (Rosenbluh et al., 2012), phénotype observé dans des lignées cellulaires présentant une activité soutenue de la voie de signalisation Wnt- β Caténine ; ce mécanisme n'est pas décrit à l'heure actuelle pour TAZ. YAP est également phosphorylable sur le résidu Y357 par la tyrosine kinase Abl ; cette phosphorylation induit une augmentation de l'interaction entre YAP et le facteur de transcription p73, conduisant à l'augmentation de la transcription de gènes pro-apoptotiques tels que Bax par fixation directe sur leur promoteur. Cette phosphorylation de YAP par Abl s'observe notamment sous traitement par le cisplatine et est indispensable à l'induction de la mort cellulaire puisque l'utilisation du mutant YAP^{Y357F} abroge l'interaction entre YAP et Abl, tout comme l'induction de Bax après traitement des cellules par la chimiothérapie (Levy et al., 2008). La phosphorylation de TAZ sur ses résidus Tyrosine est un phénomène peu décrit à l'heure actuelle, néanmoins une étude a montré que la kinase Abl est capable de phosphoryler TAZ sur son résidu Y316 en réponse à l'hyperosmolarité du milieu extracellulaire ; cependant, cette phosphorylation ne conduit pas à la formation de complexes entre TAZ et p73 (cette interaction n'est d'ailleurs pas décrite dans les données des interactomes) (Jang et al., 2012).

Les effecteurs YAP et TAZ peuvent également subir des modifications post-traductionnelles autres que la phosphorylation que sont l'acétylation ou la méthylation de la lysine 494 de YAP ou la S-glutathionylation (formation d'un pont disulfure entre un groupement glutathion et un résidu cystéine, phénomène observé pour TAZ). Ces marques vont conduire à l'activation ou l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des co-activateurs. Par exemple, la méthylation de la Lysine 494 de YAP par l'histone lysine méthyltransférase Set7 conduit à sa séquestration cytoplasmique et à la diminution de son activité transcriptionnelle. (Oudhoff et al., 2013). A l'inverse, l'ajout de groupements glutathions sur les trois résidus cystéines de TAZ (C261, 315 et 358) après production d'un stress oxydant par traitement des cellules à l'eau oxygénée ou au LPA (acide lysophosphatidique) conduit à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de TEAD et à l'activation de la transcription du CTGF (Gandhirajan et al., 2016).

La lysine 494 de YAP dans le C-terminal de la protéine est acétylée par CBP/p300 dans le noyau des cellules après action d'agents alkylants et induit l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de YAP (Hata et al., 2012). A contrario, l'action de la lysine désacétylase de classe III SIRT1 est décrite dans des modèles de carcinomes hépatocellulaires comme favorisant l'activité de YAP et inhibant l'action du cisplatine, agent alkylant. La désacétylation de YAP par SIRT1, effectuée sur des résidus non précisés du *TEAD-Binding Domain* en N-terminal, conduit à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle des complexes YAP/TEAD4 (Mao et al., 2014). Ceci nous indique que tout comme les autres modifications post-traductionnelles, les mécanismes d'acétylation/désacétylation de YAP sur divers résidus lysine peuvent avoir des effets opposés sur l'activité de régulateur transcriptionnel de YAP.

Inhibition de YAP/TAZ indépendante de leurs modifications post-traductionnelles

De par leur structure, YAP/TAZ interagissent avec une pléthore de protéines autres que les facteurs de transcription TEAD et conduisent à la modulation de leur localisation/activation. De plus, indépendamment de YAP/TAZ, des effets de compétition pour les membres de la famille TEAD peuvent être observés.

Séquestration cytoplasmique par une isoforme de TEAD4

Un mécanisme élégant de régulation de l'activité de YAP a été récemment décrit (Qi et al., 2016); il s'agit de la compétition d'une isoforme de TEAD-4 (TEAD-*short*, TEAD4-S), ne possédant pas le domaine d'interaction à l'ADN situé en N-terminal mais un domaine d'interaction à YAP indemne, avec le TEAD-4 complet (TEAD4-L). Dans différents modèles cellulaires, la surexpression de ce TEAD4-S inhibe l'activité des complexes YAP/TEAD, conduisant à l'inhibition de la prolifération et de l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. Sur deux cohortes de patients atteints de cancer colorectaux ou du poumon il est décrit que l'expression élevée de cette forme tronquée de TEAD-4 est associée à un meilleur pronostic pour les patients. Cependant, les auteurs ne sont pas intéressés à l'impact de ce TEAD4-S sur les complexes TAZ/TEAD qui seraient potentiellement tout aussi impactés.

Compétition avec les protéines VGLL

La protéine drosophilienne Vestigial (Vg) est un co-activateur transcriptionnel interagissant comme Yorkie avec le facteur de transcription Scalloped. Les protéines de la famille VGLL (Vestigial Like Proteins, 1 à 4) sont des co-activateurs transcriptionnels, homologues de la protéine Vestigial chez les mammifères et interagissant avec les facteurs de transcription TEAD. Des travaux de structure et d'interaction ont montré récemment la notion de compétition existant entre les protéines VGLL (phénomène décrit pour VGLL1) et YAP pour la formation de complexes avec TEAD4, induisant la transcription de gènes différents pour les complexes YAP/TEAD4 et VGLL1/TEAD4 (Pobbati et al., 2012).

Si VGLL1 a un effet positif sur la prolifération cellulaire lorsqu'il est surexprimé, à l'inverse la protéine VGLL4 est décrite comme suppresseur de tumeurs de dans nombreux cancers (cancers gastriques (Li et al., 2015a), cancers du poumon (Zhang et al., 2014)), son expression étant plus faible dans le tissu tumoral que dans le tissu sain adjacent. La protéine VGLL4 a une structure différente comparée aux protéines VGLL1, 2 et 3 ; en effet, VGLL4 possède deux domaines d'interaction de type Vg au lieu d'un seul domaine pour les autres membres. Au niveau mécanistique, VGLL4 s'oppose à la transcription des gènes cibles des complexes YAP/TAZ/TEAD (Cyr61, CTGF) par compétition avec TEAD4 (Jiao et al., 2014). Un article de 2015 montre que l'expression du miR130a par YAP inhibe l'expression de

VGLL4 (Shen et al., 2015), renforçant l'activité transcriptionnelle des complexes YAP/TAZ/TEAD dans de nombreux modèles cancéreux (carcinomes hépatocellulaires, cancers du poumon, etc).

Modulation par les protéines de la famille Motine

Les protéines de la famille Motine (Angiomotine, Angiomotine Like-1 et Angiomotine Like-2) sont des protéines de structure retrouvées dans les jonctions serrées membranaires des cellules de différentes origines embryonnaires, épithéliales, endothéliales, *etc.* Au niveau du tractus digestif, les transcrits des trois motines sont détectés dans tous les organes excepté dans l'intestin grêle ou dans le pancréas (Moleirinho et al., 2014). Les modèles animaux (souris ou poisson zèbre) déficients pour AMOT, AMOT-L1 ou AMOT-L2 présentent un défaut majeur dans les mécanismes d'angiogénèse et une augmentation de la mortalité embryonnaire. Dans les pathologies cancéreuses, l'expression élevée des motines est associée à une augmentation des propriétés invasives (Levchenko et al., 2004) et à une récurrence plus précoce (Couderc et al., 2016) (Jiang et al., 2006a) dans le cancer du sein.

Comme précisé dans la partie sur les études de spectrométrie de masse, AMOT (deux isoformes de 80 et 130 kDa), AMOT-L1 et AMOT-L2 ont été identifiées comme interagissant physiquement avec YAP et avec TAZ ; le domaine N-terminal des trois protéines est conservé et contient le domaine PPxY (sauf l'isoforme de 80 kDa d'AMOT qui ne possède pas ce domaine N-terminal), permettant l'interaction avec les domaines WW de YAP/TAZ.

Bien que l'interaction entre AMOTp130/AMOT-L1/AMOT-L2 et YAP/TAZ soit validée, l'action des angiomotines sur la voie Hippo reste débattue. La plupart des études réalisées sur le rôle des angiomotines décrivent un rôle inhibiteur des trois motines sur YAP/TAZ par deux mécanismes, mettant en jeu ou non les kinases de la voie Hippo. En effet, AMOTp130 stabilise la protéine NF2 (Li et al., 2015b) conduisant à l'activation de la voie Hippo; de plus, l'inactivation d'AMOT, AMOT-L1 et AMOT-L2 conduit à l'inhibition du niveau de phosphorylation de YAP et TAZ et de l'augmentation de leurs gènes cibles respectifs ((Zhao et al., 2011), (Hsu et al., 2015)). Sur le versant Hippo indépendant de l'inhibition de YAP/TAZ par les motines, ces derniers auteurs ont montré que les constructions YAP^{S5A} et TAZ^{S4A} (insensibles à la voie Hippo) sont séquestrées tout comme les formes sauvages par leur interaction avec la protéine AMOTp130 dans le cytoplasme et à la membrane des cellules. Ces différentes études montrent que les motines ont un rôle

suppresseur de tumeurs par activation de la voie Hippo et séquestration membranaire de YAP/TAZ.

Toutefois, d'autres études montrent que les motines ont un rôle oncogénique en régulant la localisation nucléaire de YAP/TAZ ou bien en étant régulées par YAP. Dans des modèles cellulaires de cancers rénaux, AMOT est localisé dans le noyau et son invalidation induit un ralentissement de la prolifération cellulaire et une relocalisation cytoplasmique de YAP (Lv et al., 2014). Des croisements de souris AMOTko avec des souris NF2ko inhibe le développement de cancers hépatiques NF2^{-/-} dépendants (Yi et al., 2013). A noter qu'une étude récente montre que l'expression de la protéine AMOT-L1 dans des cancers du sein est dépendante de YAP et que l'expression élevée d'AMOT-L1 est synonyme de récurrence précoce pour les patientes (Couderc et al., 2016). Ainsi, si l'interaction entre les motines et YAP/TAZ est avérée, son action biologique reste débattue dans la littérature.

Mécanismes de dégradation de YAP/TAZ

Le mécanisme de dégradation de YAP/TAZ est dépendant de leur hyperphosphorylation induite par les kinases de la voie Hippo. Lors de l'hyperphosphorylation de YAP par les kinases LATS1/2, la phosphorylation S381 conduit à la phosphorylation de la sérine 384 par la CK1, induisant l'interaction entre YAP et la protéine β -TRCP (*β -Transducin repeat-containing E3 ubiquitine ligase*), le motif de reconnaissance de la E3 ubiquitine ligase étant DSGXS, (Zhao et al., 2010b). La stabilité de TAZ suit le même mécanisme de phosphorylation séquentielle entre les kinases LATS et CK1 sur les résidus S311 et S314 respectivement. (Liu et al., 2010). L'interaction entre YAP/TAZ et la β -TRCP sert également de plateforme d'ancrage pour cette dernière dans le complexe de dégradation cytoplasmique de la β -Caténine (Azzolin et al., 2014).

Un mécanisme de dégradation de YAP indépendant du protéasome mais faisant intervenir l'autophagie est décrit dans des modèles murins reproduisant la sclérose tubéreuse de Bourneville (Liang et al., 2014b). Dans ce modèle murin, présentant une déficience du gène *Tsc1* qui induit une hyperactivation de la kinase mTOR, les souris présentent une augmentation de l'expression de YAP qui est induite par un défaut de prise en charge par les autophagolysosomes. L'inhibition du protéasome dans les fibroblastes murins issus de souris *Tsc2*_{+/+} ne permet pas de récapituler l'augmentation d'expression protéique de YAP, à l'inverse du traitement de ces cellules par la chloroquine, inhibiteur de l'autophagie. De plus,

une étude récente a identifié les kinases Mst1/2 comme essentielles dans les processus autophagiques par phosphorylation directe de la protéine LC-3. Ainsi, l'activation de la voie Hippo induirait potentiellement aussi l'augmentation de la prise en charge par des voies autophagiques de YAP (Wilkinson et al., 2016).

Implication de la voie Hippo dans les processus cancéreux

Depuis l'identification des fonctions biologiques dépendantes de YAP et TAZ, de nombreuses études se sont intéressées à étudier leurs rôles dans la modulation des propriétés biologiques du cancer, à savoir la régulation de la croissance tumorale, du potentiel métastatique ou encore de la résistance aux chimio-radiothérapies.

YAP et TAZ dans la progression tumorale

L'expression ou l'activité transcriptionnelle élevée de YAP et/ou TAZ conduit à l'acquisition de propriétés de prolifération, d'invasion, de migration accrues pour les cellules tumorales. L'analyse de l'expression de YAP en immunohistochimie sur différents types de tumeurs (Steinhardt et al., 2009) conduite en 2008 montre une expression plus forte de YAP (tant dans le noyau que dans le cytoplasme) dans les adénocarcinomes coliques, pulmonaires, de l'ovaire et du sein que dans les tissus sains adjacents. L'expression protéique élevée de TAZ est retrouvée dans les cancers du sein les moins différenciés, ceci étant associé à une survie globale et sans récurrence plus faible pour les patientes (Díaz-Martín et al., 2015). Dans les glioblastomes au stade IV, l'expression élevée de TAZ est corrélée à la diminution de la méthylation de son promoteur (Bhat et al., 2011) ; cette perte de méthylation est corrélée avec une survie globale plus faible des patients. Peu de cancers présentent des mutations des gènes de la voie Hippo. L'une des rares exceptions est la survenue de mutation du gène *NF2* dans le mésothéliome, le schwannome et le méningiome dans plus de 50% des cas. Ainsi, l'activation ou l'expression soutenue de YAP/TAZ passe par des mécanismes autres divers et variés. Concernant YAP, l'amplification du locus contenant le gène *YAPI* (locus 11q22) est retrouvée dans 4 % des cancers squameux de l'œsophage (Gao et al., 2014), dans 3 % des médulloblastomes (Fernandez-L et al., 2009) et dans les carcinomes hépato-cellulaires (Zender et al., 2006). La mise en jeu de mécanismes épigénétiques est également décrite, conduisant à l'inhibition de l'expression des kinases LATS1/2 dans les tumeurs neurales d'origine astrocytaire (Jiang et al., 2006b) ou dans le cancer du sein par hyperméthylation de

leurs promoteurs (Takahashi et al., 2005), cette perte d'expression étant associée avec une survie globale plus faible.

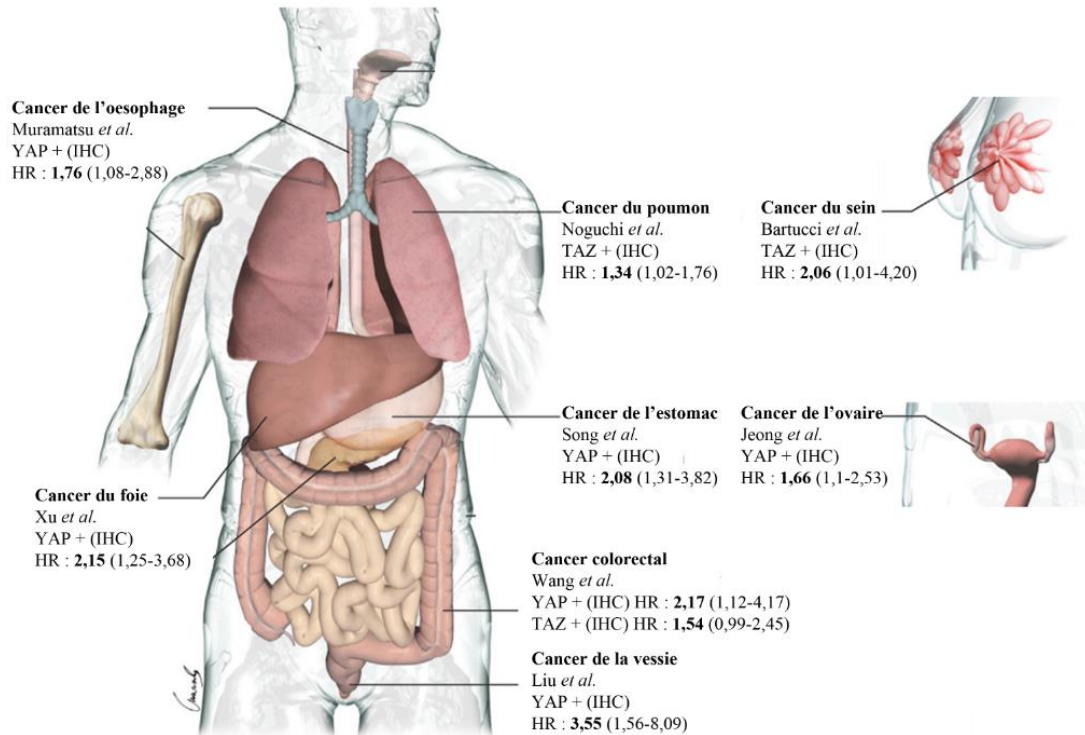


Figure n°17 Expression élevée de YAP/TAZ et impact sur la vie globale des patients (Zanconato et al., 2016) Représentation des différents types tumoraux où l'expression élevée de YAP/TAZ est un facteur indépendant pronostique de mauvaise survie globale des patients. Les noms sur la figure en face de chaque organe sont les premiers signataires des références utilisées de la bibliographie (Bartucci et al., 2014)(Muramatsu et al., 2011)(Noguchi et al., 2014)(Song et al., 2012)(Liu et al., 2013)(Wang et al., 2013b)(Jeong et al., 2014)(Xu et al., 2009).

Pour une analyse plus poussée concernant le CCR, dès les travaux de Steinhardt, des analyses d'expression de YAP en immunohistochimie montrent que le niveau d'expression nucléaire de YAP est plus important dans l'adénocarcinome colique que dans le côlon sain (79% de cancers positifs vs 44% pour le tissu sain (Steinhardt et al., 2009), plus de 95% de marquage des tumeurs primitives dans l'étude de Zhou et collaborateurs, (Zhou et al., 2011). Concernant TAZ, peu d'études sur tissus de patients ont été réalisées au niveau protéique ; l'étude de Wang et collaborateurs montre néanmoins une expression de TAZ au niveau protéique chez plus d'un patient sur deux atteint de CCR plus élevée que dans le tissu sain (Wang et al., 2013b). Aucune mutation n'est décrite dans le cadre du CCR sur la voie Hippo ; toutefois, le promoteur du gène *RASSF1A* étant retrouvé hyperméthylé dans près de 20% des

CCR (van Engeland et al., 2002). On peut imaginer que ce phénotype contribue à l'activation soutenue de YAP/TAZ par inactivation de la voie Hippo et/ou activation de la GTPase RhoB.

Au niveau génique, des études de ré-analyse de données transcriptomiques réalisées sur des tumeurs primaires de CCR (Yuen et al., 2013) (Lee et al., 2015) montrent l'existence d'une corrélation entre l'expression élevée de YAP et/ou TAZ et l'expression plus importante des cibles comme le CTGF. De plus, l'expression élevée de TAZ/CTGF/AXL (Yuen et al., 2013) ou l'expression élevée d'un panel de gènes caractéristiques de l'activité élevée de YAP1 (Lee et al., 2015) est associée à un pronostic péjoratif pour le patient, voire à une perte d'efficacité des biothérapies anti-EGFR (Cetuximab) pour les patients ne présentant pas de mutation de l'oncogène *KRAS*, reflet de l'interconnexion entre les voies YAP/TAZ et les autres voies de signalisation cellulaire telle que celle de l'EGFR. Il est intéressant de noter que les membres de la famille des facteurs de transcription TEAD que sont TEAD2 et TEAD4 sont aussi surexprimés dans le CCR en comparaison de la muqueuse colique saine adjacente (Liu et al., 2015). Toutefois, un travail va à l'opposé de tous les autres sur le rôle de YAP dans le CCR ; en effet, les travaux de Barry et collaborateurs montrent que la surexpression du transgène YAP^{S127A} inhibe l'activité de la voie Wnt/ β -Caténine. Sur leur cohorte de près de 700 patients, les patients n'exprimant pas YAP en IHC (10% de la cohorte) ont la survie globale la plus faible, comparativement aux patients exprimant YAP (Barry et al., 2013). Cependant, leurs données montrent que le transgène YAP induit par la doxycycline n'est pas restreint au noyau ; au contraire, la surexpression massive de YAP est cytoplasmique et nucléaire, suggérant le fait que le YAP cytoplasmique peut séquestrer la β -Caténine (Imajo et al., 2012).

L'activité et/ou l'expression plus élevées des effecteurs terminaux de la voie Hippo peuvent être expliquées de diverses manières. L'expression des kinases de la voie Hippo (Mst1, LATS2) est plus faible dans le CCR que dans le tissu sain adjacent (Liang et al., 2014a) ceci s'accompagnant d'une expression plus importante des transcrits de YAP, TAZ et de TEAD1. Concernant Mst1, son absence d'expression dans le tissu tumoral en comparaison du tissu sain est un facteur péjoratif concernant la survie des patients atteints de CCR (Minoi et al., 2007) (patients avec CCR de types MSS et MSI, toutefois la perte d'expression de Mst1 en IHC est de plus mauvais pronostic pour le groupe MSI). Une étude (Wierzbicki et al., 2013) s'est intéressée plus précisément à LATS1 et démontre que la perte d'expression des transcrits de LATS1 est associée à l'hyperméthylation de son promoteur dans le CCR dès les

stades II, laissant entrevoir des phénomènes de régulation épigénétique dans la dérégulation de l'activité de cette voie de signalisation.

Transformation et croissance tumorale YAP/TAZ dépendantes

Au niveau cellulaire, l'expression ou l'activité transcriptionnelle élevée de YAP et/ou TAZ conduit à l'acquisition de propriétés de prolifération et de transformation tumorale. Les formes non mutées ou constitutivement actives de YAP (YAP^{S5A} ou mutées sur Ser127 et Ser381) ont en effet un pouvoir de transformation des cellules fibroblastiques murines NIH3T3, mammaires immortalisées MCF10A (Overholtzer et al., 2006) ou cellules normales épithéliales oesophagiennes (Song et al., 2014). La transfection de YAP ou TAZ constitutivement actifs s'oppose à l'arrêt du cycle en phase G0/G1 des cellules MCF10A traitées au TGF- β , effet cytotatique observé sur les cellules immortalisées non transformées (Hiemer et al., 2014). La surexpression de ces formes de YAP induit une augmentation du potentiel tumorigénique *in vivo*. L'activité transformante de YAP est dépendante des interactions avec les facteurs de transcription TEAD, mais aussi des protéines recrutées par les domaines WW ; en effet, le pouvoir transformant de la construction YAP^{S5A} est perdu quand la sérine 94 est substituée ou quand les domaines WW sont délétés.

Transition épithélio-mésenchymateuse et invasion tumorale YAP/TAZ dépendantes

YAP et TAZ ont été caractérisés comme des acteurs modulant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), conduisant les cellules à exacerber, voire à acquérir des propriétés de cellules mésenchymateuses, par opposition aux cellules épithéliales. Il est intéressant de noter que les lignées cellulaires d'emblée moins différenciées, plus fibroblastiques (et plus invasives) expriment plus les effecteurs YAP/TAZ, comme dans le cancer du pancréas ou encore dans le cancer du sein où des lignées très invasives tels que les Miapaca-2 ou les MDA-MB 231 présentent un fort niveau d'expression de YAP/TAZ et des gènes cibles associés (Cyr61, CTGF, AXL). Dans différents modèles cellulaires, l'activation ou la surexpression de YAP ou TAZ conduit à la perte d'expression des marqueurs épithéliaux tels que la E-Cadhérine et à l'augmentation d'expression de marqueurs mésenchymateux comme la Vimentine (Cordenonsi et al., 2011) (Xie et al., 2015). Cette transition vers un phénotype mésenchymateux est également associée à un caractère invasif exacerbé. De plus, l'expression des cibles de YAP/TAZ/TEAD tel que le récepteur AXL est associée à l'induction de l'EMT

dans le cancer du sein (Asiedu et al., 2014). Les fonctions pro-invasives de YAP (et TAZ) seraient médiées principalement par le biais de TEAD, puisque les cellules tumorales transfectées par le mutant double YAP^{S94A-S127A} (n'interagissant plus avec TEAD) perdent leur phénotype métastatique chez la souris (Lamar et al., 2012) comparativement aux cellules transfectées par le mutant YAP^{S127A}.

Egalement décrit dans des modèles de cancers du sein, le facteur de transcription Zeb1, inducteur décrit de la TEM, est complexé avec YAP mais pas avec TAZ pour permettre la transcription de ses gènes cibles ; l'inactivation de Zeb1 induit la perte d'expression d'AXL, Cyr61, CTGF dans les cellules MDA-MB231 sans jouer toutefois sur le niveau de phosphorylation de YAP ou sur sa localisation subcellulaire (Lehmann et al., 2016).

YAP/TAZ : Médiateurs de l'acquisition de propriétés de cellules souches cancéreuses

Comme décrit dans les modèles animaux ou dans les cellules souches embryonnaires, les protéines YAP/TAZ sont importantes pour la prolifération des cellules souches et des progéniteurs normaux, *via* notamment la fixation de YAP sur le promoteur d'Oct4. Les effecteurs terminaux de la voie Hippo ont été dès lors caractérisés comme modulant les propriétés de cellules souches cancéreuses. La surexpression de la forme mutée de TAZ (TAZ^{S89A}) dans les lignées cancéreuses mammaires est associée à l'acquisition de propriétés fonctionnelles et phénotypiques de CSC du cancer du sein, avec augmentation de la formation de mammosphères et augmentation de la fraction CD44⁺/CD24⁻, mesurée en cytométrie en flux (Cordenonsi et al., 2011). De même, l'isolement de cellules souches cancéreuses de patientes atteintes de cancers du sein (en utilisant la même signature moléculaire, les cellules CD44⁺/CD24⁻) montre un enrichissement de l'expression de TAZ, et que l'inhibition de ce dernier inhibe la chimiorésistance intrinsèque des CSC et leur potentiel métastatique *in vivo* (Bartucci et al., 2014). La surexpression de la forme constitutivement active de YAP (YAP^{S127A}) induit également l'augmentation de la formation de sphères dans des modèles œsophagiens, par le biais de l'expression du facteur de transcription Sox9 (Song et al., 2014). Les mécanismes impliqués dans le maintien ou l'acquisition des propriétés de cellule souche cancéreuse peuvent être TEAD dépendants (fixation de TEAD sur le promoteur de Sox9 dans les lignées œsophagiennes) ou indépendants ; des travaux récents montrent le rôle de YAP dans la transcription de l'Interleukine 6 et le maintien des propriétés de CSC ; l'inhibition par shRNA de l'IL-6 induit la diminution du pourcentage de CSC

CD44⁺/CD24⁻ et le nombre de mammosphères formées dans le cancer du sein (Kim et al., 2015) Dans ce modèle, l'expression de l'IL-6 est dépendante de complexes entre YAP et le facteur de transcription SRF, et non TEAD.

Lien entre métabolisme cellulaire et YAP/TAZ

Les protéines YAP et TAZ régulent l'expression de nombreuses protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire. La réciproque est vraie puisque la modulation de voies métaboliques (glycolyse, voie du mélatonate, etc) a un impact sur l'activation ou l'inhibition de YAP et TAZ.

Influence de YAP et TAZ sur le métabolisme

YAP et TAZ sont décrits comme participant de manière active au métabolisme en induisant la transcription de gènes participant à l'anabolisme. Les travaux de Cox et collaborateurs ont démontré que la surexpression du dominant constitutivement actif de YAP (modèle YAP^{S87A}, équivalent du YAP^{S127A} humain) dans le foie de poissons zèbres induit une hyperprolifération hépatique associée à une augmentation d'expression de la Glul (Glutamine Synthétase (Cox et al., 2016)). Cette enzyme catalyse la formation de Glutamine à partir du Glutamate et d'ammoniac ; la glutamine ainsi synthétisée va servir à la synthèse des nucléotides, puriques ou pyrimidiques. L'inhibition par shRNA de YAP dans les lignées d'hépatocarcinome HepG2 et Hep3B conduit à la diminution significative de l'expression de la Glul. L'expression de Glul semble être dépendante des complexes faisant intervenir les facteurs de transcription TEAD puisque les tests rapporteurs d'activité du promoteur de l'enzyme montre que les constructions YAP^{S94A} ont une fonction transactivatrice beaucoup plus faible que le YAP^{S127A}. L'inhibition pharmacologique de la Glutamine synthétase par traitement des poissons zèbres exprimant le transgène YAP^{S87A} permet de réverser l'hépatomégalie YAP dépendante. Concernant TAZ, des études métabolomiques comparant des cellules MCF10A surexprimant le transgène TAZ^{S89A} à leur vecteur vide correspondant (Mulvihill et al., 2014) démontrent des modifications du métabolisme lipidique, notamment par augmentation de l'expression de l'enzyme PFAH1B3.

De la même manière, YAP et TAZ sont décrits comme capable de se fixer sur les promoteurs de transporteurs membranaires d'acides aminés que sont les transporteurs SLC7A5 et SLC38AI dans des lignées d'hépatocarcinome cellulaire ou la lignée HEK293.

L'expression de ces transporteurs participe à l'activation soutenue de la kinase mTORC1, kinase régulant les processus anaboliques stimulant la croissance cellulaire (Park et al., 2016)(Hansen et al., 2015).

Les acides gras de la famille des prostaglandines et plus précisément la prostaglandine E2 sont des médiateurs importants dans la progression tumorale. Une étude récente a démontré que l'inhibition de YAP induit la diminution d'expression de la Cyclooxygénase-2 dans les cellules tumorales de schwannomes déficientes en *NF2*. La stimulation des cellules par PGE₂ conduit à l'augmentation d'expression de YAP, proposant une boucle d'amplification entre ces partenaires (Guerrant et al., 2016).

Influence du métabolisme cellulaire sur l'expression de YAP/TAZ

Les travaux de Sorrentino et collaborateurs ont montré, pour la première fois, le fait que le métabolisme pouvait réguler l'activité et la localisation de YAP/TAZ ; ainsi, la voie du mévalonate, impliqué dans le métabolisme stéroïdien, régule positivement l'activité de YAP et TAZ. Le traitement de cellules cancéreuses par les statines, inhibant l'HMG-CoA réductase, induit une perte d'activité et une relocalisation cytoplasmique de YAP/TAZ (Sorrentino et al., 2014) par inhibition de la localisation membranaire et de l'activation de la rhoGTPase RhoA. La déprivation énergétique (mesurée par la baisse de l'ATP intracellulaire) conduit également à l'inactivation de YAP et TAZ par la kinase AMPK. Cette dernière, protéine senseur de la quantité d'ATP, va en s'activant phosphoryler YAP sur la Sérine 94 et conduire à la perte d'interaction entre YAP et TEAD (Mo et al., 2015).

La voie Hippo est soumise aux différents stimuli du milieu extracellulaire. La transduction du signal passe notamment *via* les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui vont s'activer en fonction de la présence de leurs ligands respectifs dans le milieu extracellulaire. YAP ainsi que de TAZ sont activés par (Yu et al., 2012) le traitement par les phospholipides ou sphingolipides (acide lysophosphatidique ou sphingosine-1-phosphate) et activation des protéines G12/13 ; de plus, l'inactivation de YAP et TAZ inhibent l'augmentation de la prolifération médiée par le LPA. L'utilisation d'autres ligands de RCPG couplés à d'autres protéines G (tels que le glucagon) conduit à l'inverse à l'augmentation du niveau de phosphorylation de YAP via la protéine Gs. Dès lors, une fois établi le lien entre récepteurs couplés aux protéines G/protéines G et YAP/TAZ, des études dans le mélanome

uvéal ont démontré que, la présence de mutation activatrice des protéines $G_{\alpha q}$ ou $G_{\alpha 11}$ (présente dans 80% des cas) conduit à une diminution de la phosphorylation de YAP et à l'augmentation de son activité transcriptionnelle (Feng et al., 2014)(Yu et al., 2014).

Interactions entre Hippo et autres voies de signalisation cellulaire

Comme précisé dans la description des co-activateurs YAP et TAZ, ces derniers peuvent interagir avec les facteurs de transcription TEAD via leur partie N-terminal, mais également avec de nombreuses autres protéines par leur domaine WW. Ces propriétés font que YAP/TAZ se trouvent impliqués dans la modulation de nombreuses autres voies de signalisation cellulaire, tout en étant parfois eux-mêmes régulés par ces voies. On peut citer le lien unissant la voie Hippo et la voie Wnt/ β -Caténine, d'autant plus que le gène codant le régulateur négatif de la β -Caténine APC est muté dans une grande majorité des CCR et que la β -Caténine peut permettre la transcription de YAP. Les voies EGFR/MAPK, Smad et Notch, dérégulées dans les CCR, sont également décrites comme interagissant avec les co-activateurs transcriptionnels YAP/TAZ, comme décrit ci-dessous.

YAP/TAZ et β -Caténine

La relation entre ces deux/trois partenaires est assez ambiguë ; en effet, des travaux décrivent un rôle inhibiteur de YAP/TAZ sur la β -Caténine (via la séquestration, puis la dégradation cytoplasmique de cette dernière (Imajo et al., 2012), ou par la transcription de DKK-1 (Seo et al., 2013), antagoniste des ligands Wnt) ou alors un rôle transactivateur, en étant ou non complexé avec le facteur de transcription TBX5 (Rosenbluh et al., 2012). L'ajout de Wnt3a, ligand activateur de la voie Wnt conduit à la stabilisation de la protéine TAZ (Azzolin et al., 2012), protéine retrouvée dans le complexe de séquestration et de dégradation de la β -Caténine en absence de stimulation par le Wnt3a. Une étude de 2007 montre également que la stimulation de cellules cancéreuses coliques par le ligand Wnt3a et par le TGF- β induit la surexpression des gènes cibles de YAP/TAZ que sont Cyr61, CTGF et Ankrd1 (Labbé et al., 2007). Par ailleurs, les protéines YAP/TAZ cytoplasmiques servent de plate-forme de recrutement de la β -Trcp lorsque la voie Wnt est inhibée, aboutissant à la dégradation de la β -Caténine (Azzolin et al., 2014).

Il est important de prendre en compte les dynamiques de localisation des partenaires ; en fonction de leur localisation subcellulaire YAP/TAZ peuvent jouer des rôles antagonistes

sur la signalisation Wnt ; en effet, dans les travaux d'Imajo et collaborateurs, seul le YAP phosphorylé en S127 (et cytoplasmique) exerce un rôle d'inhibiteur sur la β -Caténine ; la suppression de MST1/2 ou LATS1/2 dans des lignées cellulaires de cancer-colorectaux (Imajo et al., 2012) ou les modèles murins déficients en MST1/MST2 confortent cette hypothèse puisque ces invalidations s'accompagnent d'une augmentation de l'activité transcriptionnelle de la β -Caténine, mesurée par rapporteur luciférase ou via l'expression de ses gènes cibles *Lgr5* ou *Ascl2*. Par ailleurs, la restauration d'une protéine APC fonctionnelle dans des lignées colorectales déficientes comme les SW480 induit un ralentissement significatif de la prolifération et la diminution d'expression du facteur de croissance CTGF, cible décrite des complexes YAP/TAZ/TEAD (Azzolin et al., 2012).

YAP/TAZ et TGF- β -BMP/SMAD

Le TGF- β est l'un des facteurs sécrétés le mieux décrit pour son rôle ambivalent, anti-tumoral dans des stades précoces de cancérogénèse puis protumoral dans les phases tardives. Dès 2008, les travaux de Varelas (Varelas et al., 2008)(Varelas et al., 2010) et collaborateurs ont démontré que sous l'action du TGF- β , YAP et TAZ sont complexés avec les facteurs de transcription Smad2/3, médiateurs de l'action du TGF- β . L'invalidation de l'expression de YAP/TAZ inhibe l'activité transcriptionnelle des facteurs Smad en test d'activité rapporteur luciférase. Concernant les fonctions anti ou protumorales du TGF- β , la transfection des formes constitutivement actives de YAP et de TAZ (YAP^{S5A} ou TAZ^{S4A}) dans la lignée non tumorigénique mammaire immortalisée MCF10A inhibe l'effet cytotatique du TGF- β (Hiemer et al., 2014), suggérant que l'état d'activation de YAP/TAZ est un déterminant important dans la balance pro/antitumoral des effets du TGF- β . De plus, ces auteurs ont réalisé des puces d'expression montrant qu'une centaine de gènes est communément régulée lors de l'invalidation de YAP/TAZ, TEAD ou le traitement par le SB-431542, antagoniste du TGF- β . Parmi ces gènes se trouvent *Cyr61* et *CTGF*. Le traitement au TGF- β aboutit également à la dégradation protéosomale de la protéine RASSF1A par le recrutement de la E3 ligase Itch au récepteur du TGF- β de type I, aboutissant au transport nucléaire des complexes YAP/Smad2. (Pefani et al., 2016).

YAP/TAZ et voie Notch

La voie de signalisation Notch est dérégulée dans de nombreuses pathologies, celle-ci étant observable par l'augmentation d'expression du fragment clivé *NICD* (*Notch IntraCellular Domain*) des récepteurs Notch ou l'augmentation de ses gènes cibles Hes-1 et Sox9. Dans le CCR, l'activation de Notch et l'expression de Hes1 est indispensable au potentiel tumorigénique des cellules souches cancéreuses coliques (Sikandar et al., 2010). Dans des modèles d'hépatocytes/d'hépatocarcinomes et des modèles intestinaux, l'inactivation des kinases Mst1/2 ou l'activation de YAP induit l'augmentation d'expression du NICD, de Hes1 (Zhou et al., 2011) ainsi que des récepteurs Notch1/2 et du ligand Jagged-1 (Yimlamai et al., 2014). Des études de régulation transcriptionnelle ont montré la régulation directe de la voie Notch par YAP/TAZ/TEAD par étude de Chip, démontrant la fixation de TEAD4 sur le promoteur de Jagged-1 (Tschaharganeh et al., 2013) ou de Notch2 (Yimlamai et al., 2014). Par ailleurs, une étude dans une série de CCR montre la corrélation d'expression en Jagged-1 et YAP (Tschaharganeh et al., 2013), confortant le dialogue entre ces deux voies de signalisation.

YAP/TAZ et voie EGFR/MAPkinases

L'activation ou l'inhibition de YAP/TAZ sont régulées par des signaux extracellulaires, dont l'EGF, un des ligands de l'EGFR qui inhibe la voie Hippo. Les travaux de Haskins (Haskins et al., 2014) ont montré que la Neureguline-1, ligand de HER4 (ErbB4) induit l'activation de YAP et la transcription du CTGF, tout comme le traitement des cellules MCF10A à l'EGF conduit à l'activation de YAP et à son recrutement sur le promoteur du CTGF (Fan et al., 2013). De même, TAZ est décrit comme permettant la transcription des ligands des récepteurs de la famille ErbB, tels que la Neureguline, l'amphiréguline ou l'epiréguline (Noguchi et al., 2014), alors que YAP intervient dans la transcription de EGFR et ErbB4, *via* les facteurs de transcription TEAD (Song et al., 2015). Ainsi, les deux voies de signalisation sont capables de l'activer mutuellement.

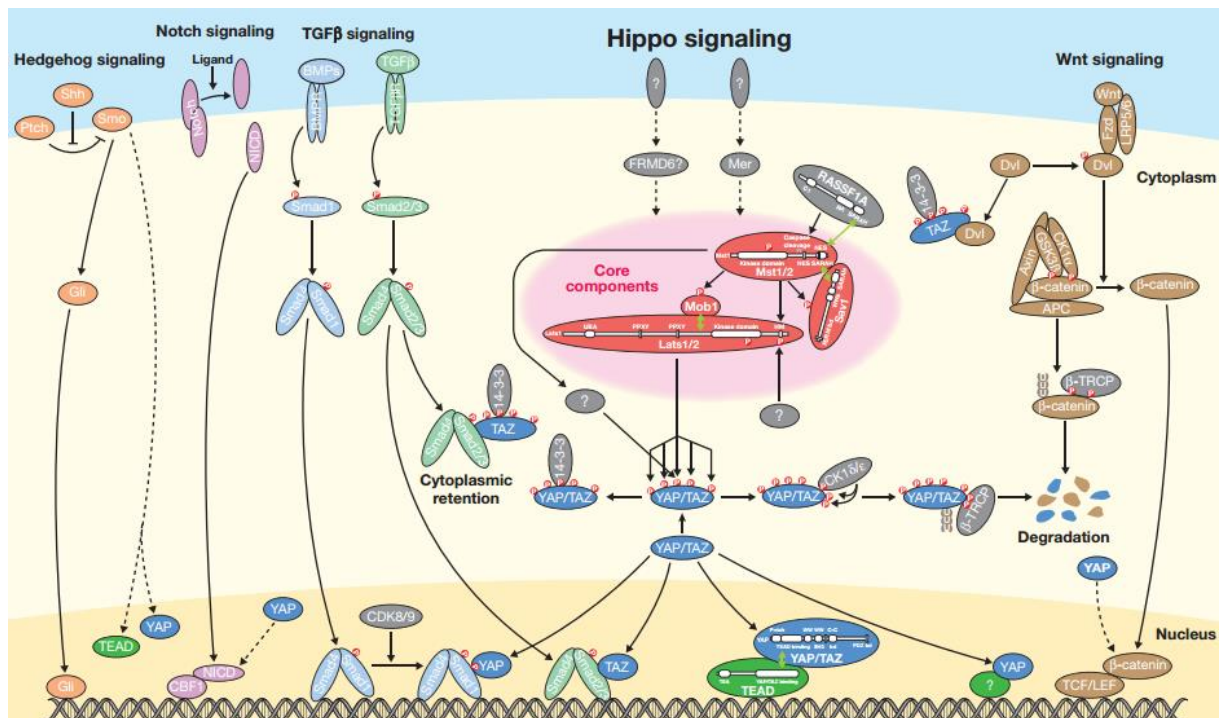


Figure n°18 : Interaction entre la voie de signalisation Hippo et les voies Wnt, TGF-β et Notch. Schéma de la référence (Zhao and Li, 2010).

YAP/TAZ et réponses aux chimiothérapies

Les fonctions de YAP et de TAZ ont été étudiées dans la réponse aux différents protocoles de chimiothérapie existant ; nous aborderons dans cette partie les thérapies ciblées ou non de tumeurs solides ou leucémiques.

YAP/TAZ et chimiothérapies "conventionnelles"

Peu d'études s'intéressent à la fois à YAP et à TAZ ; les travaux de Chen et al. (Chen et al., 2015) démontrent dans le cancer du pancréas que l'expression importante du mir-181c aboutit à l'hypophosphorylation et à l'activation de YAP et de TAZ, ceci s'accompagnant d'une sensibilité plus faible à la Gemcitabine.

Diverses études de 2010 à 2015 démontrent que YAP et TAZ sont impliqués dans la résistance aux poisons du fuseau mitotique comme le Taxol (Xia et al., 2014)(Huang et al., 2013)(Bartucci et al., 2014)(Overholtzer et al., 2006) dans des modèles variés tels que le cancer du sein, de l'ovaire ; concernant TAZ, une étude de 2011 dans le cancer du sein décrit que la chimiorésistance dépendante de TAZ est médiée par les facteurs de transcription TEAD et plus spécifiquement par leurs cibles Cyr61 et CTGF (Lai et al., 2011). Les agents

cytotoxiques ou les antimétabolites comme les sels de platine (Oxaliplatine, Cisplatine) ou le 5-Fluorouracile voient également leurs effets cytotoxiques ou cytostatiques diminués lorsque les lignées cellulaires sont transfectées par des formes actives de YAP (Song et al., 2015). Cependant ces résultats doivent être contrebalancés par d'autres études réalisées qui démontrent un rôle pro-apoptotique de YAP sous traitement par diverses chimiothérapies. Le cisplatine induit dans des modèles sains immortalisés ou de cancers colorectaux (Levy et al., 2008) l'activation de la kinase Abl qui va phosphoryler YAP sur le résidu Y357 et permettre à la fois la stabilisation de p73 par YAP par compétition avec l'ubiquitine ligase Itch (Levy et al., 2007) mais aussi la formation de complexes YAP/p300/p73 et leur recrutement sur les promoteurs de gènes pro-apoptotiques (Strano et al., 2005). De même, l'activation d'Abl et la phosphorylation de YAP sur la tyrosine 357 induisent une diminution de l'activité transcriptionnelle des protéines TEAD et l'expression de Cyr61 et CTGF, réorientant les fonctions de YAP (Keshet et al., 2014). Ce rôle pro-apoptotique est diminué après traitement des cellules au Glivec® (inhibiteur de tyrosine kinase) inhibant Abl ou lorsque YAP est invalidé dans les lignées. De même, l'activation de la voie Hippo diminue la sensibilité des cellules aux irradiations ; en effet, dans des cellules MCF10A, la transfection de LATS2 induit la phosphorylation (sur le résidu T197) et l'inactivation d'Abl, inhibant les complexes pro-apoptotiques YAP/p73 après irradiation des cellules (Reuven et al., 2013).

YAP et thérapies ciblées/biothérapies

Comme précisé dans la partie sur le CCR, de nombreuses biothérapies ou thérapies ciblées sont utilisées en complément des thérapies conventionnelles, voire en deuxième/troisième ligne thérapeutique pour les patients dont les tumeurs ne répondent pas aux protocoles habituels. A l'inverse des chimiothérapies conventionnelles où YAP et TAZ semblent intervenir, seul YAP est décrit à l'heure actuelle comme modulant l'efficacité des inhibiteurs ou anticorps thérapeutiques. Concernant les anti-EGFR, YAP est décrit comme diminuant les effets des inhibiteurs comme l'Erlotinib ou le Gefitinib dans le cancer du poumon (Lee et al., 2016) ou de l'ovaire (Zhang et al., 2011). Dans le cas du CCR, une étude de 2014 réalisée sur des données issues de transcriptome montre que pour les patients arborant un profil transcriptomique reflétant une activité transcriptionnelle élevée de YAP, ces derniers ne bénéficient pas du traitement par le Cetuximab (bien que ces patients ne présentent pas les mutations activatrices de l'oncogène *KRAS*). On peut aussi remarquer que

YAP est décrit comme permettant la transcription et l'expression de l'EGFR (Song et al., 2015), appuyant le lien unissant ces deux acteurs.

Les travaux de Lin et al. (Lin et al., 2015) se sont intéressés particulièrement aux mécanismes d'échappement de différentes tumeurs (mélanome, CCR, cancer de la thyroïde, etc) aux inhibiteurs spécifiques de la kinase mutée B-Raf^{V600E} (Vemurafenib) ou de MEK1/MEK2 (Trametinib). Les auteurs ont mis en évidence le rôle prépondérant de YAP dans la résistance des cellules tumorales à ces inhibiteurs de la voie MAPkinase, ceci confortant l'importance du dialogue entre les voies YAP/TAZ et la voie de signalisation MAPkinase. Dans ces travaux, les auteurs ont pu augmenter de manière drastique la cytotoxicité du Vemurafenib ou du Trametinib après invalidation de YAP dans différentes lignées cellulaires présentant la mutation B-Raf^{V600E}.

Ciblage thérapeutique de la voie Hippo

Depuis l'identification de la voie Hippo et de ses effecteurs comme acteurs dans les propriétés de prolifération, d'invasion, de chimiorésistance des cancers, la recherche de molécules capables d'inhiber ces protéines est d'actualité. En effet, il apparaît dès lors pertinent de cibler directement ces acteurs en amont des gènes cibles tels que le CTGF (Aikawa et al., 2006) ou AXL (Leconet et al., 2014) protéines pour lesquelles des anticorps ou inhibiteurs thérapeutiques sont disponibles.

A l'inverse de ces objectifs, nous pouvons citer la découverte d'une molécule inhibant les kinases MST1/MST2 dans le cadre de l'augmentation de la régénération tissulaire (Fan et al., 2016) ; toutefois l'on peut imaginer que ces molécules soient utilisées sur une période brève du fait du phénotype induit par la perte d'activité de ces kinases (Cf modèles murins déficients pour Mst1/2).

Les premières données identifiant des molécules inhibant la voie Hippo sont issues des travaux de Liu-Chittenden et collaborateurs publiés en 2012 (Liu-Chittenden et al., 2012) aboutissant à l'identification des porphyrines, notamment la Verteporfine (VP) comme inhibiteur de l'interaction entre YAP et TEAD2. Depuis 2012, de nombreux travaux ont utilisé la VP comme inhibiteur pharmacologique de YAP, tant *in vitro* qu'*in vivo*, travaux dont nous avons tenté de faire la liste exhaustive dans notre revue de la littérature (Gibault et al., 2016) (voir Annexes du manuscrit). Cependant, comme précisé dans la revue, la VP n'est

pas exempte de défaut ; d'une part, cette molécule est photo-activable ; ainsi, les manipulations avec la VP doivent se faire le plus possible à l'abri de la lumière. La question reste également de savoir si la VP est capable d'inhiber le complexe entre TAZ et TEAD, puisqu'elle n'a été caractérisée que comme jouant un rôle inhibiteur sur le complexe entre YAP et TEAD2. De plus, des travaux récents (Zhang et al., 2015) ont identifié la VP comme une molécule avec des propriétés protéotoxiques, aboutissant à l'oligomérisation aberrante de nombreuses protéines de poids moléculaire supérieure à 60 kDa ; ainsi, l'on ne peut s'assurer que les effets biologiques observés avec la VP soient dus exclusivement à l'inhibition du complexe YAP/TEAD.

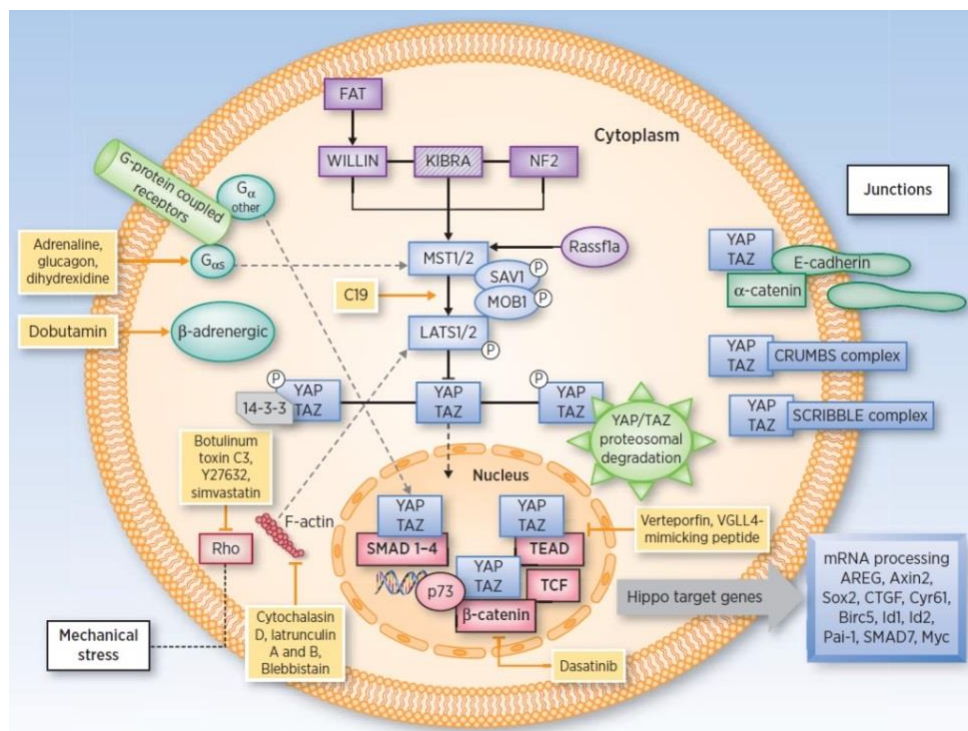


Figure n°19 : Représentation des différentes molécules connues comme modulateurs de la voie Hippo (figure issue de la revue (Sebio A and Lenz H-J, 2015)) Les molécules vont jouer à différents niveaux en bloquant le complexe entre YAP/TAZ et les facteurs de transcription TEAD, ou alors en activant la voie Hippo.

D'autres molécules que la VP vont agir en bloquant la formation des complexes entre YAP/TAZ et les facteurs de transcription TEAD ; on peut citer le peptide synthétique mimétique dérivé de VGLL4 (Super TDU) qui va entrer en compétition avec les facteurs de transcription TEAD ((Jiao et al., 2014)) et ainsi entraîner la rupture du complexe entre YAP et TEAD dans des modèles de cancers gastriques. Toutefois, comme pour la VP, les auteurs ne se sont pas intéressés aux effets du Super TDU sur les complexes entre TAZ et TEAD dans ce type de cancer.

Diverses classes de molécules agissant sur les récepteurs couplés aux protéines G vont être capables de moduler l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ/TEAD via l'activation des kinases de la voie Hippo ; nous pouvons citer parmi celles-ci les agonistes des récepteurs à l'Adrénaline comme l'Epinephrine ou le Glucagon qui vont activer indirectement les kinases LATS1/LATS2 *via* la PKA (Yu et al., 2013)(Yu et al., 2012).

Un inhibiteur développé récemment, la molécule C19, a été décrite comme activant les kinases Mst1 et LATS1 dans différentes lignées cancéreuses et aboutissant à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de TEAD mais aussi des voies de signalisation Wnt et TGF- β par inhibition de l'expression de TAZ. Cependant les auteurs ne montrent pas d'effet sur la phosphorylation et l'inhibition de YAP par cette molécule (Basu et al., 2014). Deux inhibiteurs de tyrosine kinases ont été décrits récemment (Dasatinib et le Pazopanib) comme permettant de conduire à la dégradation protéosomale de YAP et de TAZ (Oku et al., 2015)(Taccioli et al., 2015). Le mode d'action du Dasatinib peut également passer par l'inhibition de la tyrosine kinase Yes1, membre des SRC kinases, protéine connue comme activant YAP par phosphorylation sur la tyrosine 357 (Rosenbluh et al., 2012) et impliquée dans la formation des complexes entre YAP et la β -Caténine.

La famille des Statines a été identifiée courant 2014 dans deux études en parallèle (Sorrentino et al., 2014)(Wang et al., 2014b) comme inhibant la localisation nucléaire de YAP et de TAZ par l'inhibition de l'enzyme HMG-CoA réductase, enzyme de la voie du mévalonate, précurseurs de nombreux métabolites (stéroïdiens, *etc*). Des études précédentes utilisant des statines sur des modèles murins APC^{min/+} induit la réduction de la formation de tumeurs dans l'intestin et le côlon des souris (Swamy et al., 2006), de même des études épidémiologiques sur le CCR montrent un bénéfice de survie pour les patients bénéficiant d'un traitement par les statines (Cardwell et al., 2014). Nous pouvons supposer que les effets anti-tumoraux des statines passeraient en partie par l'inhibition de YAP/TAZ. Un essai clinique italien de phase II (TRINACRIA, numéro d'essai clinique NCT02416427) est en cours sur l'utilisation de statines (Atorvastatine) comme inhibiteur de TAZ pour des patientes atteintes de cancer du sein de stades I ou II ; le recrutement des patientes doit être complet pour fin 2016 donc les résultats de l'étude ne seront pas connus avant plusieurs années (les critères de réponse étant analysés en IHC par des marquages KI-67, TAZ, AXL et CTGF). Toutefois, au vu des effets pléiotropiques des statines, l'effet direct sur TAZ semble difficile à analyser.

Objectifs du travail

Le Cancer Colo-Rectal est l'un des cancers épithéliaux les plus fréquents et les plus mortels au monde. Malgré l'amélioration constante des thérapeutiques, la survenue 1- d'une résistance au traitement et 2- d'une récurrence loco-régionale ou métastatique impactent directement le pronostic du patient. Dans la littérature, les notions de maladie résiduelle et de dormance tumorale permettent d'expliquer d'une part la maintenance de cellules tumorales dans les sites métastatiques, leur survie et d'autre part de comprendre comment la rechute peut émerger après des mois, voire des années post-prise en charge thérapeutique.

Des travaux préalables de l'équipe ou de la littérature (Dunne et al., 2014) ont montré que l'exposition chronique à la chimiothérapie de cellules tumorales coliques permet d'isoler des populations cellulaires avec des propriétés invasives augmentées, médiées notamment par le récepteur de chemokines CXCR4 (Dessein et al., 2010). Une étude réalisée sur une cohorte de MHCCR montre également la dérégulation de l'expression des récepteurs CXCR et de leurs ligands après traitement par chimiothérapie (Dessein et al., 2010)(Desurmont et al., 2015). Le récepteur CXCR4 est décrit dans la littérature comme marqueur de cellules souches cancéreuses (Yi et al., 2014); dès lors, notre groupe s'est attaché à investiguer les propriétés de cellule souche de populations chimiorésistantes, en particulier suite à une exposition à la chimiothérapie. J'ai intégré le laboratoire en 2012 en Thèse et mes travaux de recherche étaient orientés vers la compréhension des mécanismes de régulation de la quiescence cellulaire induite suite à l'exposition au 5FU.

Les résultats obtenus ont permis de montrer un rôle clé de la voie c-Yes/YAP dans ces mécanismes de balance entre la quiescence et la prolifération. Ils seront présentés en 3 parties correspondant respectivement à l'étude des mécanismes de quiescence chimio-induite (publication dans *Clinical Cancer Research*, partie I des résultats) et à l'étude du rôle des protéines YAP et TAZ dans la régulation de la balance quiescence/prolifération cellulaire (publication dans *Oncotarget*, partie II et III des résultats). A terme, les objectifs de ces travaux consistent en la compréhension des mécanismes moléculaires permettant de contrôler la prolifération ou la quiescence pour tenter de limiter la récurrence tumorale, soit en tuant les cellules tumorales quiescentes, soit au contraire en favorisant cet état non prolifératif.

Résultats

I Etude des mécanismes de quiescence chimio-induite

1.1 Caractérisation de modèles chimiorésistants du CCR

Le point de départ de ce travail est fondé sur l'étude d'une série de modèles cellulaires colorectaux tumoraux résistants aux chimiothérapies que sont le 5FU ou l'Oxaliplatine. Nos principaux modèles d'études sont les sous-populations cellulaires clonales (clones de la famille des 5F), dérivés de la lignée parentale HT29 STD par pression de sélection au 5FU, puis sélection clonale (Leteurtre et al., 2004) (détails dans l'Appendice technique). Ces clones possèdent un comportement invasif variable, dépendant pour la population clonale 5F7 de la surexpression du récepteur CXCR4, gène surexprimé 40 fois dans la population 5F7 par rapport à la population parentale HT29. Nous avons voulu dans un premier temps évalué la réponse moléculaire et cellulaire de ces populations clonales chimiorésistantes lors d'une réexposition à la chimiothérapie.

La première étape a été la caractérisation du potentiel de chimiorésistance de ces clones. Pour cela, les cellules ont été exposées (HT29) ou réexposés (5F7 et 5F31) au 5FU en réalisant des tests MTT avec des doses croissantes de chimiothérapie.

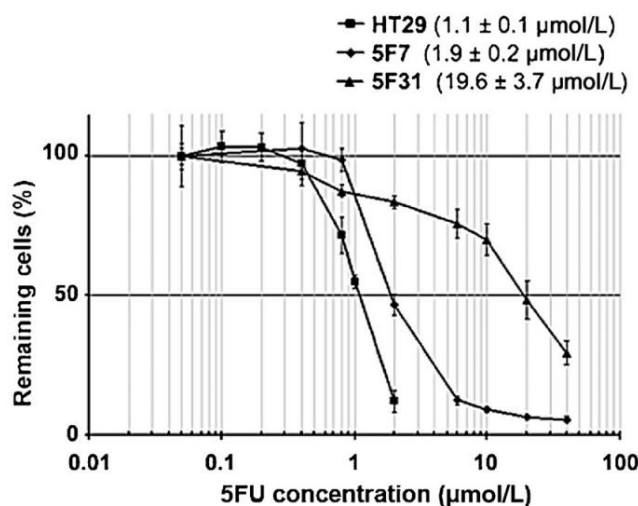


Figure n 20 : Détermination des IC₅₀ des populations cellulaires HT-29, 5F7 et 5F31. Les cellules sontensemencées et traitées avec une gamme de 5FU allant de 0,6 à 40 µM pendant 96 heures. Les valeurs des IC₅₀ déterminées sont précisées au-dessus des courbes à coté de chaque population cellulaire.

Les trois populations présentent une capacité de résistance à la chimiothérapie variable avec une population parentale la plus sensible (Concentration inhibitrice de 50% de la croissance cellulaire $IC_{50} = 1,1 \mu M$), une sous-population clonale faiblement chimiorésistante (5F7, $IC_{50} = 1,9 \mu M$) et une sous-population clonale très chimiorésistante, les 5F31 (avec une IC_{50} 20 fois supérieure à la lignée HT29 à $19,6 \mu M$). Ces résultats sont cohérents avec l'analyse transcriptomique réalisée sur ces différentes populations cellulaires montrant que l'expression de la thymidilate synthase, enzyme ciblée par le 5FU et dont l'expression élevée est associée à la résistance au 5FU, est respectivement 2 et 10 fois plus élevée dans les 5F7 et 5F31 comparativement aux HT29.

Depuis plus d'une dizaine d'année, la théorie des cellules souches cancéreuses propose un modèle de développement tumoral fondé sur une hiérarchisation de la tumeur, au même titre qu'un tissu sain. Ainsi, une fraction de cellules tumorales serait capable d'initier et d'entretenir la tumeur (Reya et al., 2001). Une étude préalable dans le CCR avait montré que le traitement au 5FU ou à l'Oxaliplatine induisait une augmentation des propriétés et des marqueurs membranaires de cellules souches (Dallas et al., 2009).

Pour le phénotypage, nous avons caractérisé ces populations cellulaires en analysant l'expression des marqueurs de cellules souches décrits pour le CCR (les protéines membranaires CD44, CD24, CD133 et CD166 (Vermeulen et al., 2008) par cytométrie en flux) ainsi que l'expression de l'isoforme 1A3 de l'enzyme Aldéhyde Déshydrogénase (les cellules souches tumorales présentant un enrichissement de cette enzyme) mesurée par RT-qPCR. L'ALDH1A3 avait été retrouvée fortement exprimée dans les cellules 5F31 comparativement aux cellules 5F7 par analyse transcriptomique.

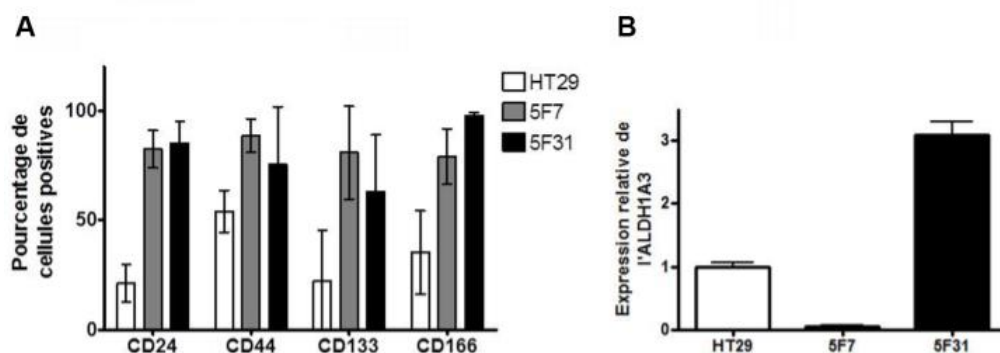


Figure n°21 : Phénotypage des marqueurs de CSC des populations HT29, 5F7 et 5F31. **A** Analyse par cytométrie en flux des marqueurs membranaires CD24, CD44, CD133 et CD166 à la surface des cellules HT-29, 5F7 et 5F31. **B** Expression des transcrits de l'ALDH1A3 dans les populations HT-29, 5F7 et 5F31

Nous observons l'enrichissement en marqueurs de CSC dans les populations cellulaires clonales chimiorésistantes en comparaison de la lignée parentale HT29. Ces dernières surexpriment fortement les protéines membranaires CD24, CD44, CD133 et CD166. Nous avons également observé une surexpression importante de l'isoforme 1A3 de l'enzyme Aldéhyde Déshydrogénase dans le clone 5F31, alors que son niveau d'expression est inférieur dans le clone 5F7 à celui de la population parentale. Ces résultats illustrent l'hétérogénéité des phénotypes des clones chimiorésistants obtenus après sélection chronique au 5FU. Nous avons complété le phénotypage par l'étude des capacités des sous-populations clonales à croître sans ancrage sous la forme de sphères, test fonctionnel des propriétés de cellules souches saines ou tumorales (Reynolds and Weiss, 1992). Les différentes populations ont été ensemencées à la même densité puis le nombre de sphères formées a été compté après une semaine de culture.

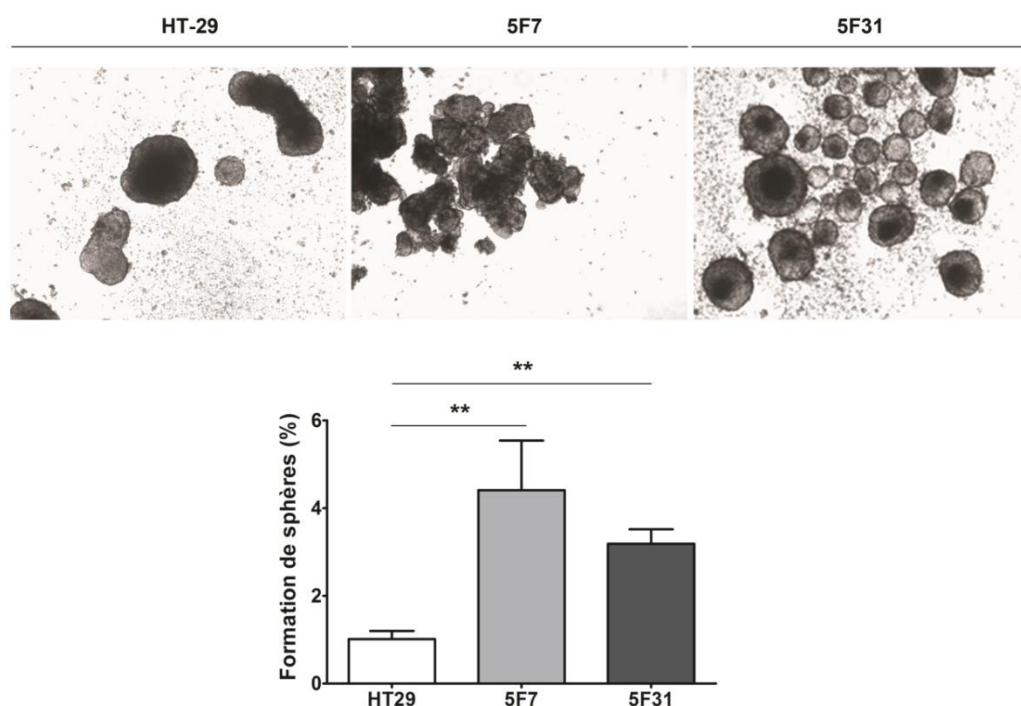


Figure n°22 : Capacité à former des sphères exacerbée dans les modèles clonaux chimiorésistants en comparaison avec la lignée parentale sensible. Clichés des sphères formées par les cellules HT29, 5F7 et 5F31 numération du nombre de sphères formées après 1 semaine. Grossissement x20. **: p -value < 0,01.

Nous avons observé que les cellules chimiorésistantes 5F7 et 5F31 forment plus de sphères que les cellules parentales, pour un même nombre de cellules ensemencées, avec augmentation respective d'un facteur 3 et 4 pour les cellules 5F31 et 5F7. Nous avons pu également remarquer des différences au niveau de la morphologie des sphères formées ;

irrégulières et agrégées pour les cellules parentales et 5F7, régulières et bien individualisées pour les cellules 5F31.

Ainsi, les cellules chimiorésistantes 5F7 et 5F31 présentent une augmentation des propriétés de cellules souches comparativement à la population parentale.

1.2 Réponses variables à la réexposition à la chimiothérapie

Etant donné les variations phénotypiques et les potentiels de résistance variables, nous sommes intéressés à étudier les réponses cellulaires de ces différentes sous-populations après réexposition à la chimiothérapie. Nous avons analysé la réponse des trois types cellulaires après exposition au 5FU à la demi-dose ou à des doses supérieures de l'IC₅₀. Nous avons analysé la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (Sub-G1, G0/G1, S et G2/M) en association avec l'utilisation d'un anticorps anti-Ki67 pour discriminer les cellules en phase G1 des cellules quiescentes en G0.

A

		SubG1	G0	G1	S	G2/M
5FU						
HT29	-	0,9 ± 0,1%	0,5 ± 0,2%	56,4 ± 1,2%	27,8 ± 0,8%	15,6 ± 1,2%
	½ IC ₅₀	2,9 ± 0,1 %	0,6 ± 0,1%	40,1 ± 0,2%	35,8 ± 0,5%	15,9 ± 1,5%
	2 IC ₅₀	5,7 ± 0,2%	0,7 ± 0,2%	36,8 ± 1,3%	39,1 ± 1,2%	15,7 ± 1,2%
5F7	-	1,7 ± 0,1%	1,8 ± 1,0%	74,4 ± 0,2%	17,5 ± 1,2%	4,6 ± 1,0%
	½ IC ₅₀	2,2 ± 0,2%	1,6 ± 0,2%	44,2 ± 1,8%	37,6 ± 1,3%	14,1 ± 0,8%
	2 IC ₅₀	1,4 ± 0,8%	2,6 ± 0,2%	27,7 ± 1,5%	53,5 ± 1,8%	14,5 ± 0,9%
5F31	-	4,3 ± 0,2%	2,9 ± 0,1%	55,5 ± 1,2%	13,9 ± 1,3%	26,8 ± 1,8%
	½ IC ₅₀	1,8 ± 0,1%	12,3 ± 3,0%	61,0 ± 1,9%	14,1 ± 1,4%	10,8 ± 1,2%
	2 IC ₅₀	1,9 ± 0,1%	50,4 ± 1,3%	17,9 ± 1,3%	15,7 ± 0,2%	15,0 ± 0,5%

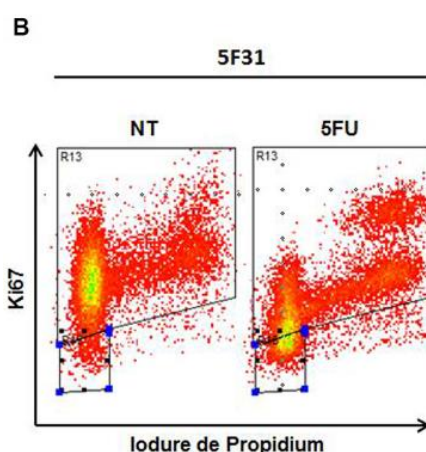


Figure n°23 : Induction de quiescence sous 5FU dans la population cellulaire 5F31. A Répartition des cellules des différentes populations cellulaires traitées ou non au 5FU (2 fois l'IC₅₀) dans les différentes phases du cycle cellulaire (SubG1, G0/G1, S, G2/M). **B** Illustration de l'analyse de la

fraction cellulaire en phase G0 du cycle cellulaire (zone délimitée par les carrés bleus) pour les cellules 5F31 non traitées ou traitées 96 heures au 5FU (40 μ M) par la technique du double marquage Iodure de Propidium/Ki67.

Ainsi, les cellules répondent de différentes manières ; les cellules HT29 parentales et le clone faiblement chimiorésistant 5F7 vont s'arrêter de proliférer et s'accumuler en phase S du cycle cellulaire. A l'inverse, le modèle le plus chimiorésistant, le clone cellulaire 5F31, s'accumule de manière importante en phase G0 du cycle cellulaire (**Figure n°23**). Ces premiers résultats nous montraient que l'on pouvait utiliser les modèles 5F7 et 5F31 pour étudier les mécanismes à l'origine de l'induction de la quiescence lors de l'exposition au 5FU.

La quiescence étant décrite comme permettant aux cellules d'échapper à la chimiothérapie, nous avons étudié les capacités de reprise de prolifération des trois populations cellulaires, après traitement au 5FU. Sont illustrées dans la figure les cellules contrôle non traitées ainsi que les cellules traitées pendant 96 heures puis sevrées pendant 1 semaine.

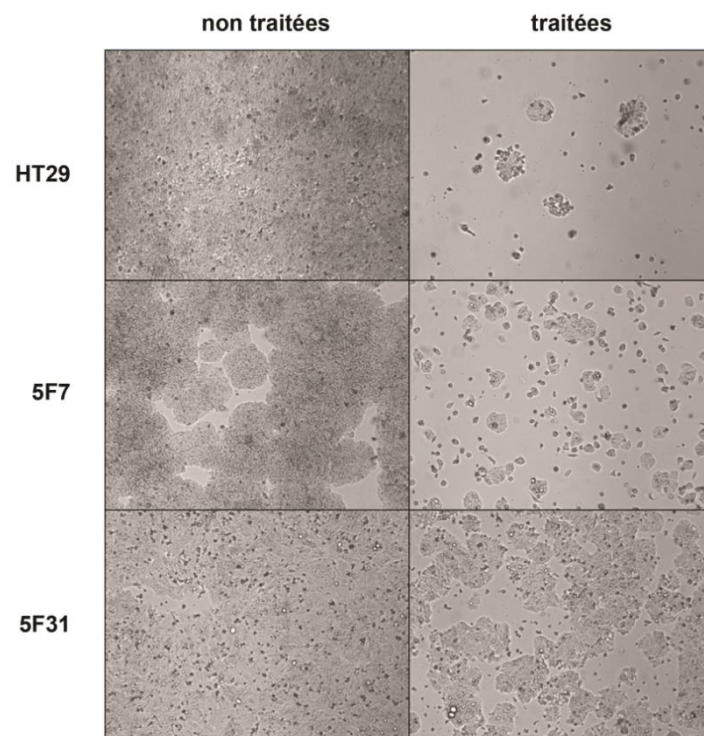


Figure n°24: Reprise de prolifération accrue après traitement par chimiothérapie des cellules 5F31. Clichés des cellules HT29, 5F7, 5F31 après traitement ou non par 5FU. Grossissement x40.

Le clone 5F31 capable d'entrer en quiescence sous traitement par le 5FU présente la reprise de prolifération la plus rapide lorsque la drogue est retirée du milieu de culture

(Figure n°24), malgré une dose de 5FU respectivement 20 et 10 fois supérieure à celles utilisées pour traiter les HT29 et les 5F7 (2 et 4 μ M).

Suite à ces premières observations, nous avons voulu entreprendre une analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires associés à ces différents types de réponse à la chimiothérapie.

1.3 Mécanismes cellulaires et moléculaires induits par la chimiothérapie

Pour étudier de façon systématique les voies de signalisation mises en jeu dans les différentes conditions, nous avons réalisé un *phosphokinase array* comparant les conditions suivantes : cellules 5F7 et 5F31, traitées ou non par le 5FU pendant 96 heures. Les résultats sont représentés sur la figure n°25.A.

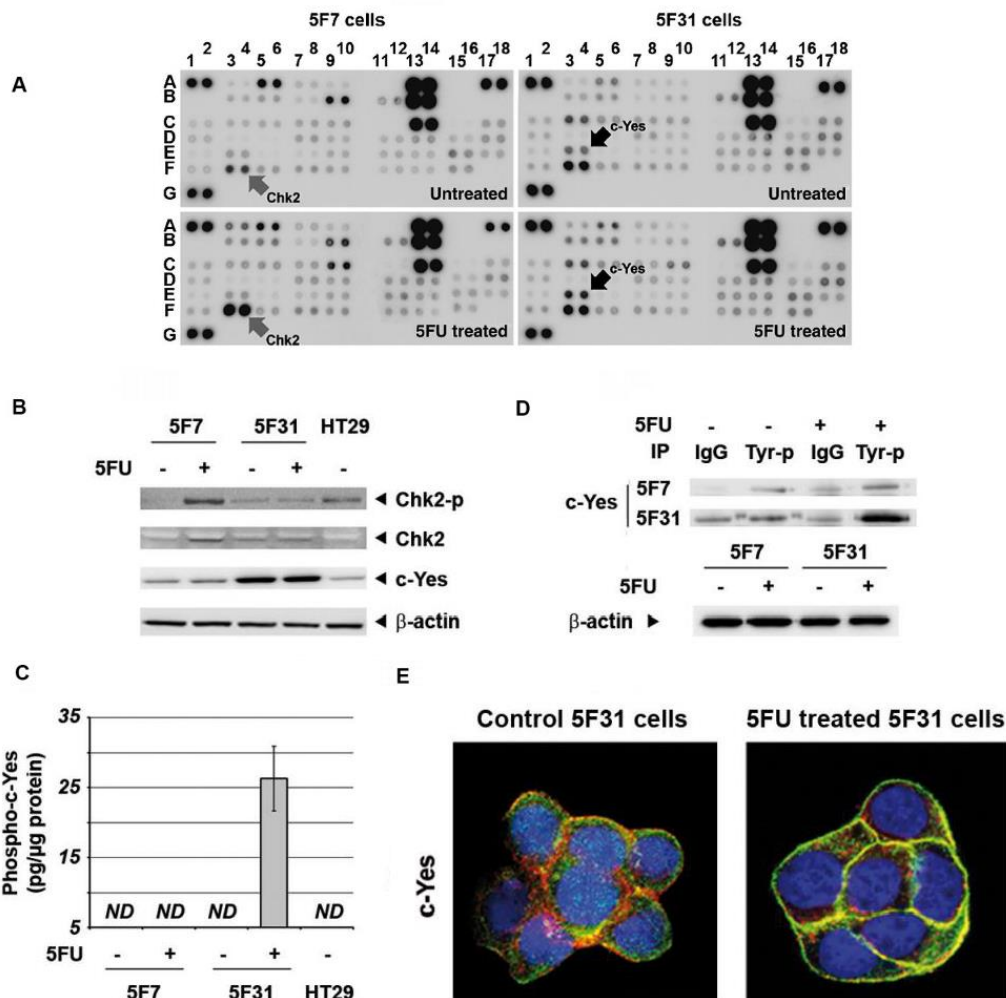


Figure n°25: Activation et délocalisation de la Src kinase c-Yes sous chimiothérapie dans les cellules 5F31 quiescentes. A Clichés du Phosphoarray réalisé avec les lysats cellulaires des cellules

5F7 et 5F31 traitées ou non au 5FU pendant 96 heures (aux doses de 4 et 40 μ M respectivement pour les 5F7 et 5F31) Les flèches pointent les protéines dont le niveau de phosphorylation varie sous 5FU. **B** Expression de P-Chk2, Chk2, c-Yes et la β -Actine dans les cellules HT29, 5F7 et 5F31, traitées ou non traitées au 5FU (respectivement 4 et 40 μ M pendant 96 heures). **C** Dosage de la forme phosphorylée de c-Yes dans les cellules HT29, 5F7 et 5F31, traitées ou non traitées au 5FU (respectivement 4 et 40 μ M pendant 96 heures). **D** Analyse de l'expression de la protéine c-Yes après immunoprécipitation des lysats par un anticorps P-Tyrosine des cellules 5F7 et 5F31 traitées et non traitées. La β -Actine ci-dessous sert de contrôle de charge. **E** Localisation de la Src kinase c-Yes par Immunofluorescence dans les cellules 5F31 traitées ou non au 5FU (96 heures, 40 μ M). ND : non détecté.

Parmi les principales différences observées sur le *phosphokinase array*, les cellules 5F7 traitées par chimiothérapie et bloquées en phase S du cycle cellulaire se caractérisent par une augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine Checkpoint kinase 2 (Chk2) en comparaison des cellules non traitées. Cette augmentation de P-Chk2 n'est pas observée dans les cellules 5F31 quiescentes sous chimiothérapie. Notons cependant que ces dernières présentent un niveau de phospho-chk2 élevé en condition basale. L'activation de la protéine kinase Chk2 est effectuée par la kinase ATM en réponse aux dommages de l'ADN, induits par radiations ou par la chimiothérapie (Matsuoka et al., 1998).

Dans les cellules 5F31 traitées au 5FU, l'une des principales variations de phosphorylation concerne la protéine c-Yes sur son résidu Tyrosine 426. C-Yes est une tyrosine kinase de 62 kDa de la famille Src. Parmi les 9 membres des src kinases, 3 sont ubiquitaire (Src, Yes et Fyn) et partagent des domaines fonctionnels tels qu'une séquence en N-terminal permettant leur ancrage membranaire après myristoylation, des domaines d'interaction protéique de type SH3 (*Src Homology Domain*) et SH2 et le domaine catalytique possédant l'activité tyrosine kinase en C-terminal (Boggon and Eck, 2004). Dans la littérature, de par la forte homologie entre c-Src et c-Yes (80% d'homologie sur la séquence totale et 90% d'homologie pour le domaine catalytique), il est généralement acquis que ces deux acteurs protéiques auraient une forte redondance dans leurs fonctions cellulaires. Cependant, il est décrit que l'activation de c-Yes (et son autophosphorylation sur la tyrosine 426) est de plus mauvais pronostic dans le CCR métastatique que l'activation de c-Src (Han and Curley, 1996). De plus, l'inhibition de c-Yes dans la lignée HT29 conduit à la délocalisation de la β -Caténine et à la diminution du volume des xénogreffes effectuées chez la souris, témoignant du rôle de c-Yes dans la progression tumorale (Sancier et al., 2011). Une différence importante concernant le trafic de c-Yes est la présence d'un site de palmytoylation non

retrouvé sur c-Src, pouvant accentuer sa stabilité à la membrane plasmique (Koegl et al., 1994).

Ne disposant pas d'anticorps spécifique de la phosphorylation du résidu Y426 de c-Yes, nous avons étudié la phosphorylation de c-Yes sur ses résidus tyrosine par Immunoprécipitation (A noter que l'expression totale de la src kinase c-Yes est plus importante dans les cellules 5F31 que dans les cellules HT29 et 5F7). Pour cela, nous avons immunoprécipité toutes les protéines phosphorylées sur leurs tyrosines des lysats 5F7 et 5F31, non traitées et traitées au 5FU, puis réalisé un western blot anti c-Yes. Les résultats ont montré l'augmentation importante du niveau de phosphorylation de c-Yes sur ses résidus tyrosine dans les cellules 5F31 traitées au 5FU (**Figure n°25.D**). De plus, un test Elisa a permis de valider cette augmentation de la forme phosphorylée de c-Yes sur le résidu tyrosine 426 dans les cellules 5F31 quiescentes. Ainsi, ces résultats viennent confirmer l'activation de c-Yes dans les cellules 5F31 entrant en quiescence sous chimiothérapie. Nous avons ensuite étudié la distribution cellulaire de c-Yes par immunofluorescence. Les résultats montrent (**Figure n°25.E**) que le traitement par le 5FU induit une relocalisation à la membrane plasmique de la protéine c-Yes.

Ainsi, les réponses différentielles observées entre les cellules 5F7 et 5F31 traitées par 5FU s'associent à l'activation de voies de signalisation cellulaires différentes : pour les cellules 5F7 une activation soutenue de la voie de réponse aux dommages de l'ADN ATM/Chk2 associée à un arrêt dans le cycle cellulaire. A l'inverse, le traitement des cellules 5F31 par le 5FU induit une entrée en quiescence associée à l'activation et la délocalisation de la Src kinase c-Yes.

1.4 Etude du rôle de la Src kinase c-Yes dans le modèle 5F31

Pour étudier le rôle de c-Yes dans les cellules 5F31, deux constructions plasmidiques contenant des *short-hairpin* RNA différents (sh1 et sh2) ciblant c-Yes ont été transfectées dans les cellules 5F31. Des cellules 5F31 ont été également transfectées avec le plasmide codant pour un shRNA ne ciblant aucun ARNm (*Scramble*, Scr). Les constructions utilisées proviennent de la référence (Sancier et al., 2011). Nous avons analysé l'impact de l'inhibition de l'expression de c-Yes sur l'induction de quiescence.

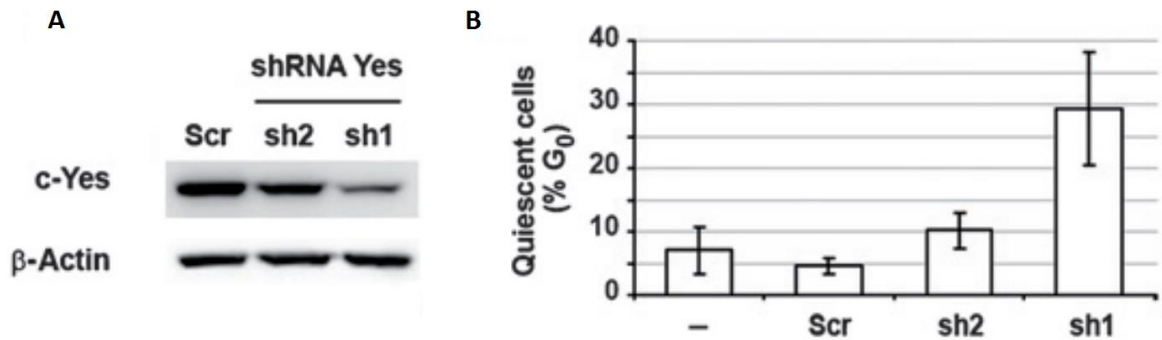


Figure n°26: L'invalidation de c-Yes augmente le pourcentage de cellules 5F31 quiescentes. A Expression protéique de c-Yes et de la β -Actine dans les cellules 5F31 transfectées avec un vecteur *Scramble* ou transfectées par le plasmide codant les shARNs ciblant c-Yes (populations sh1 et sh2). **B** Pourcentage de cellules quiescentes dans les mêmes populations cellulaires mesuré par cytométrie en flux, en condition standard de culture.

La diminution de l'expression de c-Yes dans le modèle 5F31 se traduit par l'augmentation du pourcentage de cellules quiescentes, et ce de manière dose dépendante puisque le pourcentage de cellules en phase G₀ est le plus important pour les cellules 5F31 sh1 avec le meilleur rendement d'invalidation de c-Yes. C-Yes est donc impliquée dans la prolifération des cellules chimiorésistantes 5F31. Ainsi, la diminution de c-Yes par shARN ou sa relocalisation à la membrane plasmique lors du traitement par le 5FU induisent la quiescence cellulaire. Ces résultats suggèrent que dans les deux conditions, que des mécanismes ou des partenaires de cette Src kinase sont impliqués dans l'induction de quiescence.

Nous nous sommes alors intéressés au co-activateur transcriptionnel YAP identifié comme interagissant avec c-Yes. Cette protéine est connue pour réguler la prolifération des cellules souches intestinales normales. Comme précisé en Introduction, le rôle de trans-activateur de la protéine YAP va être tributaire de sa localisation nucléaire. Nous avons étudié l'influence de la perte d'expression de c-Yes sur la répartition nucléo-cytoplasmique de la protéine YAP et avons étudié l'influence du traitement au 5FU/l'interaction entre ces deux acteurs par immunoprécipitation.

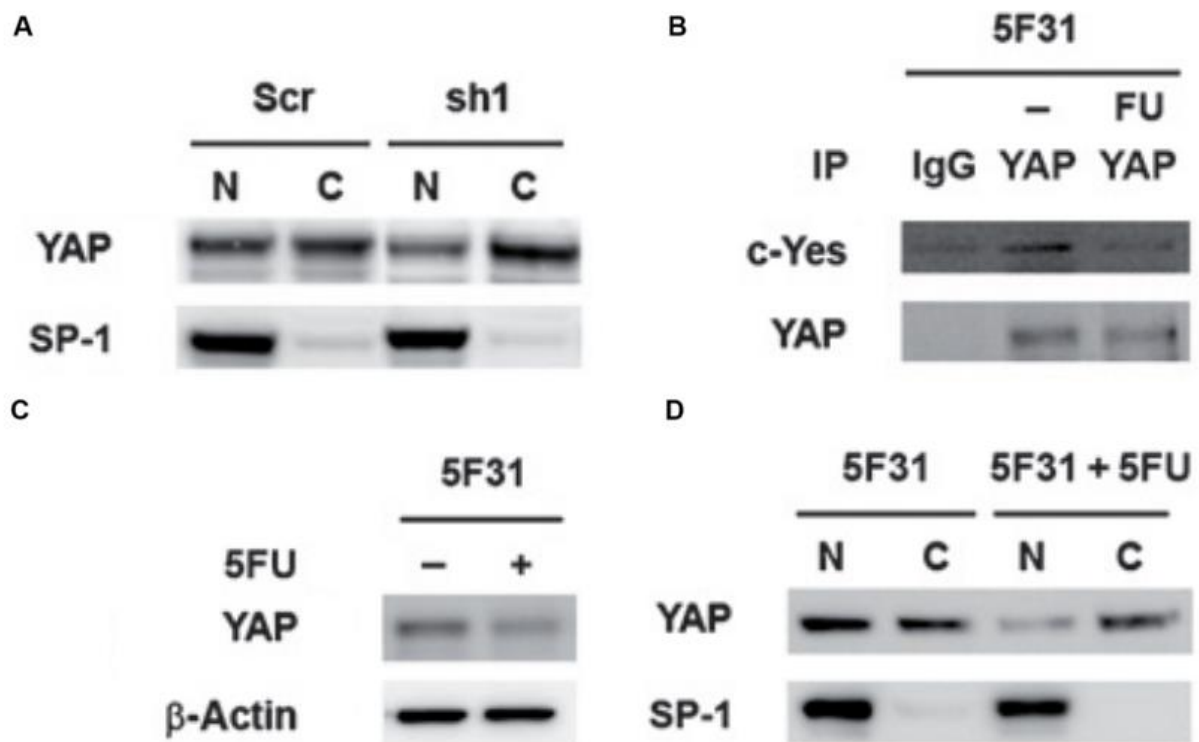


Figure n°27: L'inhibition de c-Yes ou sa délocalisation induit une diminution de la quantité de YAP nucléaire. **A** Fractionnement biochimique nucléocytoplasmique des lysats de cellules 5F31 Scr et 5F31 sh1. L'expression de YAP et du facteur de transcription SP1 est étudiée dans le Noyau (N) ou le cytoplasme des cellules (C). **B** Immunoprécipitation avec un anticorps anti-YAP suivi de la révélation par Western blot de c-Yes et YAP en contrôle d'IP. **C** Western total sur lysats totaux de cellules 5F31 traitées ou non au 5FU (96 heures, 40 μ M). **D** Fractionnement biochimique nucléocytoplasmique des lysats de cellules 5F31 non traitées ou traitées au 5FU (96 heures, 40 μ M). L'expression de YAP et du facteur de transcription SP1 est étudiée dans le Noyau (N) ou le cytoplasme des cellules (C).

Lors de l'analyse par Western blot de la localisation subcellulaire après invalidation de la Src kinase c-Yes, nous observons une diminution nette de la quantité de YAP nucléaire au profit de sa localisation cytoplasmique (**Figure n°27.A**). Comme visible sur la **Figure n°27.C**, le traitement par le 5FU s'accompagne d'une diminution de l'expression de YAP total de 35% ainsi que de sa localisation nucléaire. L'expérience de co-immunoprécipitation sous chimiothérapie représentée sur la **figure n°27.B** montre une perte d'interaction entre les protéines YAP et c-Yes de plus de 75 % par rapport au contrôle non traité.

Ainsi, l'inhibition de l'expression de c-Yes entraîne une diminution de la quantité nucléaire de YAP, suggérant l'importance de l'interaction entre ces deux partenaires dans la translocation de YAP dans le noyau et son activité (l'activité de Yes dans les cellules souches embryonnaires murines induit l'activité de YAP et sa fixation sur les promoteurs de gènes de pluripotence, (Tamm et al., 2011). Lors du traitement au 5FU, la Src kinase c-Yes est activée,

relocalisée à la membrane plasmique, phénomène associé à la diminution d'expression nucléaire de YAP, permettant d'associer entrée en quiescence et diminution du YAP nucléaire. Nous nous sommes ensuite tournés vers des études d'expression génique sur des prélèvements de métastases hépatiques de cancers colorectaux.

1.5 Analyse de l'expression des transcrits de YAP et c-Yes dans une cohorte de métastases hépatiques de patients

Nous avons étudié l'expression des transcrits YAP et Yes dans une cohorte de tissus comprenant 49 résections de métastases hépatiques de patients atteints de cancers colorectaux. Nous avons ségrégé la cohorte en deux bras, suivant que les patients aient reçus (28 patients) ou non (21 patients) une chimiothérapie néo-adjuvante.

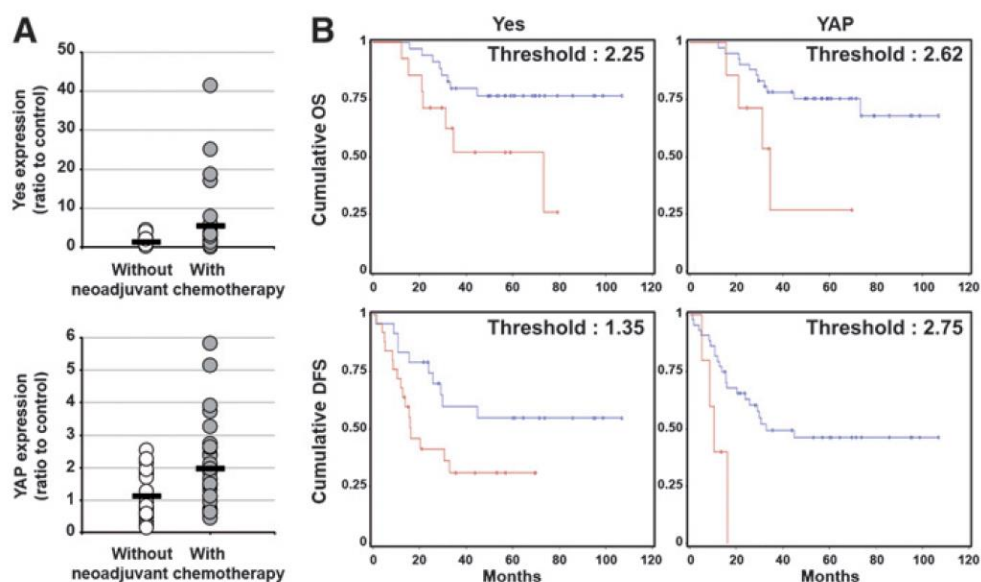


Figure n°28: L'expression élevée de YAP et de c-Yes est associée à une récurrence plus précoce et à une survie globale plus faible. **A** Expression de YAP et c-Yes dans les groupes de patients ayant reçu un régime de chimiothérapie en néoadjuvant (17 patients ont reçu du FOLFOX, 10 du FOLFIRI avec Bevacizumab et un FOLFIRI seul). **B** Courbes de survie globale et de survie sans récurrence des patients en fonction du niveau d'expression de YAP et de c-Yes. La courbe bleue correspond aux patients exprimant faiblement Yes ou YAP, la courbe rouge correspondant aux patients exprimant fortement c-Yes et YAP dans le tissu métastatique.

Le niveau d'expression des deux transcrits est augmenté de manière significative dans le groupe de patients ayant reçu une chimiothérapie en néo-adjuvant (augmentation de 4,2 fois pour c-Yes, p -value = 0,035 et de 1,7 fois pour YAP, p -value = 0,026), signifiant que la chimiothérapie a pu sélectionner des cellules présentant une dérégulation de l'axe c-Yes/YAP

(Figure n°28.A). Signalons que le gène *YES1* codant c-Yes est localisé à proximité du gène *TYMS* codant la thymidylate synthase sur le chromosome 18, zone susceptible d'être amplifiée suite à des traitements de chimiothérapie dans le CCR métastatique (près de 20% des patients ayant reçu une chimiothérapie en néo-adjuvant présente cette amplification génique (Watson et al., 2010)(Wang et al., 2001)). Nous retrouvons par ailleurs une expression plus importante de la thymidylate synthase, ainsi que de c-Yes au niveau protéique dans les cellules 5F31 comparativement aux cellules parentales HT-29.

L'analyse de la récurrence tumorale et de la survie globale des patients **(Figure n°28.B)** fait également apparaître que ceux exprimant fortement c-Yes et YAP ont une récurrence plus précoce et une survie globale moindre comparativement aux patients exprimant faiblement les deux partenaires. Ainsi, les partenaires c-Yes et YAP ont un rôle important dans la récurrence métastatique des patients atteints de CCR.

Conclusion de la partie I

Cette partie du travail s'est intéressée à des populations cellulaires chimiorésistantes du CCR ; nous avons pu observer que

- Les clones cellulaires chimiorésistants dérivés de la population parentale HT29 présentent une augmentation de leurs caractères « souches » avec augmentation de l'expression de marqueurs et de propriétés fonctionnelles associées aux CSC.
- La population la plus résistante au 5FU sort de manière dynamique du cycle cellulaire après traitement au 5FU. Le sevrage de la drogue de chimiothérapie s'accompagne d'une forte reprise de prolifération de ce modèle cellulaire, contrairement aux autres modèles cellulaires arrêtés en phase S du cycle après chimiothérapie.
- L'induction de quiescence dans le modèle 5F31 s'accompagne d'une activation et de la délocalisation à la membrane de la Src kinase c-Yes et de la perte d'expression nucléaire de la protéine YAP. L'invalidation par shRNA de c-Yes conduit à un défaut de localisation nucléaire de YAP, montrant le rôle du couple c-Yes/YAP dans le maintien nucléaire de YAP.
- L'adjonction de chimiothérapie en néo-adjuvant chez des patients atteints de CCR métastatiques est associée à une expression plus élevée des transcrits de c-Yes et de YAP dans les métastases hépatiques. De plus, l'expression élevée des transcrits de c-Yes et de YAP est associée à une survie sans récurrence et une survie globale plus faible pour les patients.

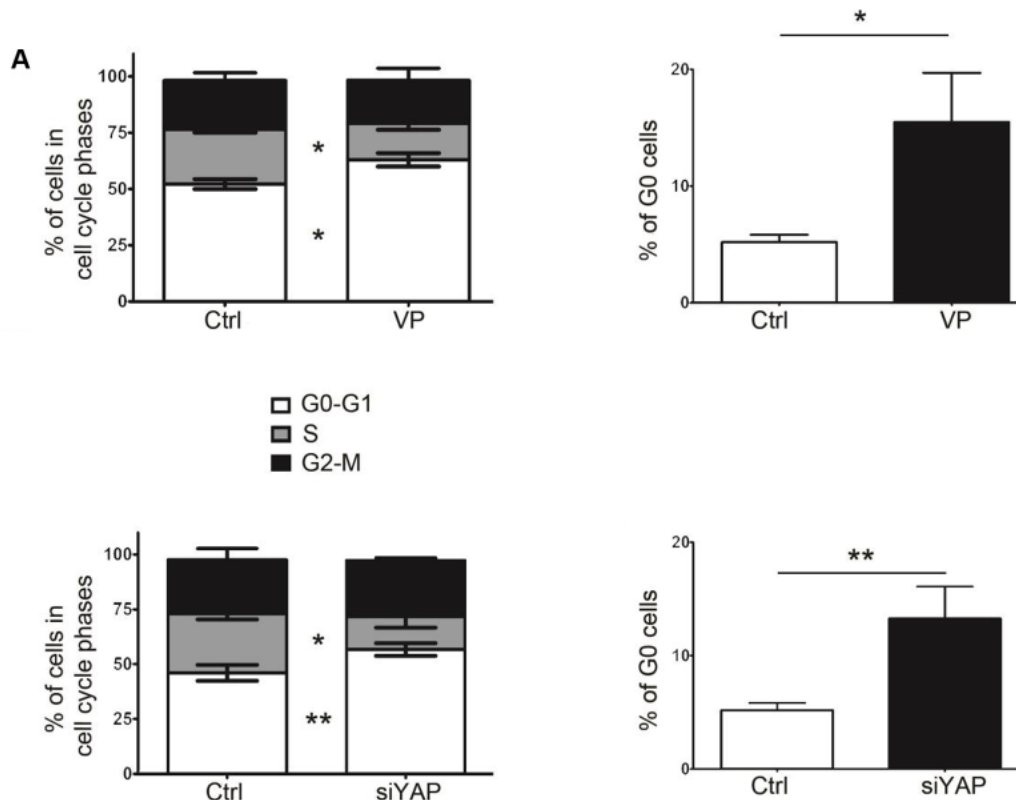
Mettant en évidence de façon concomitante l'entrée en quiescence et la diminution du YAP nucléaire actif, la seconde partie de notre travail s'est attachée à déterminer si YAP jouait un rôle dans cette transition entre la prolifération et la quiescence cellulaire des cellules tumorales coliques.

II Etude du rôle de YAP et de son paralogue TAZ dans la régulation de la balance prolifération/quiescence cellulaire

2.1 Inhibition de YAP et retentissement sur le cycle cellulaire des cellules 5F31

La première question posée était de savoir si la diminution de l'expression de YAP est l'un des moteurs de cette sortie réversible du cycle cellulaire des cellules 5F31 sous chimiothérapie.

La première stratégie expérimentale mise en œuvre est l'invalidation transitoire de YAP par ARN interférence ou son inhibition pharmacologique par traitement des cellules à la Verteporfine (VP), molécule utilisée couramment dans la littérature en tant qu'inhibiteur de l'interaction entre YAP et TEAD (Liu-Chittenden et al., 2012). Le modèle cellulaire 5F31 est transfecté par lipofection avec les siARNs ciblant YAP ou les siARN Contrôle (Ctrl) ne ciblant aucun ARNm. Concernant le traitement à la VP, la dose de 10 μ M pendant 48 heures a été retenue du fait de sa faible cytotoxicité (moins de 7% de cellules mortes en comparaison au contrôle avec le DMSO). Nous avons étudié l'effet du siYAP et du traitement à la VP sur le cycle cellulaire, le pourcentage de cellules quiescentes par cytométrie en flux et la prolifération cellulaire par numération cellulaire.



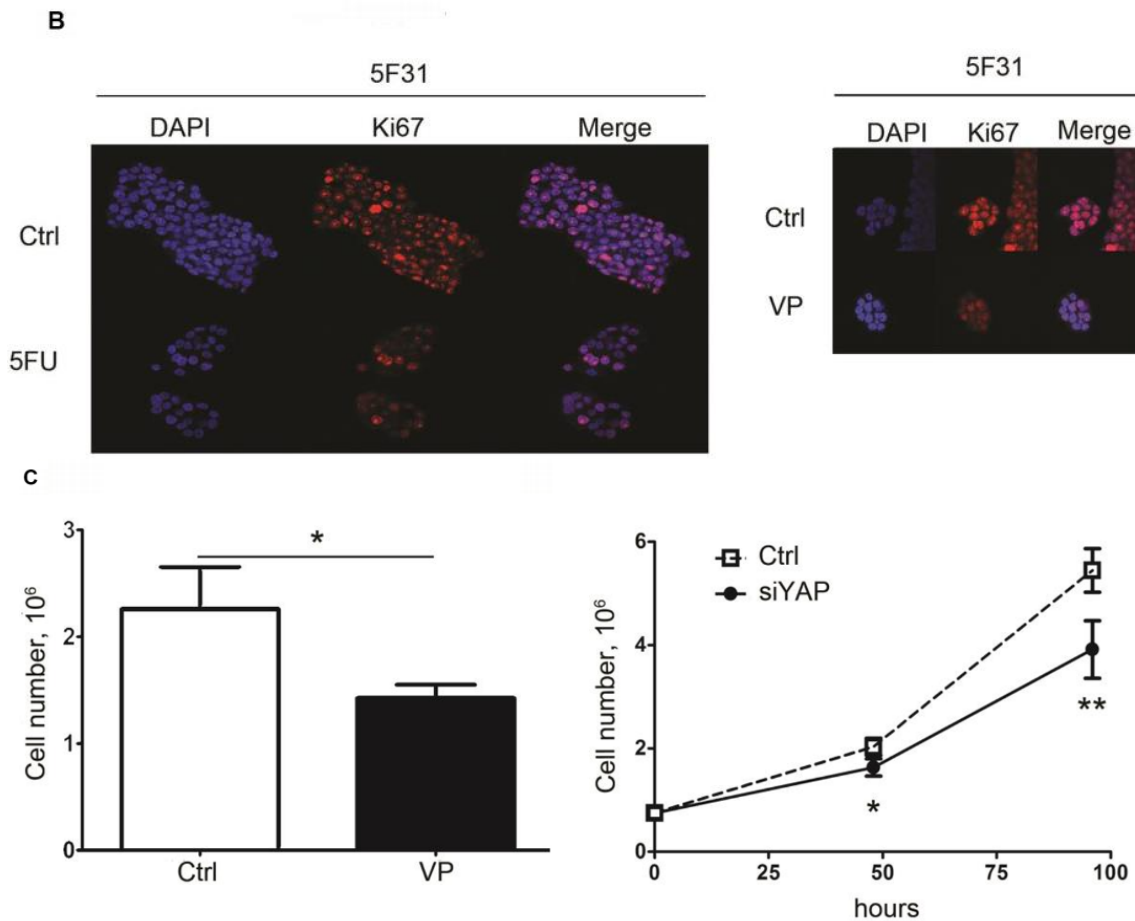


Figure n°29: Augmentation de la fraction de cellules quiescentes non cyclantes après inhibition de YAP dans le modèle cellulaire 5F31. **A** Les cellules 5F31 ont été traitées 48 heures à la VP (10µM) ou avec les siARNs ciblant YAP puis analysées en cytométrie en flux. Les différentes phases du cycle cellulaire sont représentées (pic G0-G1, phase S, pic G2-M) en fonction des conditions ainsi que le pourcentage de cellules quiescentes. * : *p-value* < 0,05. ** : *p-value* < 0,01. **B** Les cellules 5F31 ont été traitées 48 heures à la VP (10µM) ou au 5FU pendant 96 heures (40µM). L'expression du Ki67 est étudiée en Immunofluorescence par marquage indirect avec un anticorps Alexa Fluor 594 suivi du contremarquage des noyaux avec le DAPI. Clichés pris au grossissement x40. **C** Les cellules 5F31 ont été traitées avec 10 µM de VP pendant 48 heures avec numération ou comptées à 48 et 96 heures post transfection avec les siCtrl ou siYAP. * : *p-value* < 0,05. ** : *p-value* < 0,01.

La diminution de l'expression de YAP ou son inhibition pharmacologique modifie la répartition du cycle cellulaire des cellules 5F31 avec une augmentation de la fraction de cellules en phase G0-G1 au détriment de la phase S. En réalisant le co-marquage Iodure de Propidium/anticorps anti Ki67, l'analyse de la fraction de cellules quiescentes (Ki67 négatives/2n ADN) montre que l'inhibition de YAP augmente le pourcentage de cellules en quiescence ($13,3 \pm 2,8$ versus $5,2 \pm 0,6$ pour les cellules contrôles, *p-value* < 0,01). Le traitement à la VP augmente également la fraction de cellules quiescentes ($15,8 \pm 2,9$ versus

4,9 ± 0,9 pour les cellules contrôles, *p-value* < 0,05, **Figure n°29.A**). Ces résultats sont donc en faveur de l'implication de YAP dans le maintien des cellules chimiorésistantes 5F31 en prolifération. Cet effet, représenté pour la VP, a été confirmé en Immunofluorescence (**Figure n°29.B**), la perte de l'expression du Ki67 nucléaire sous traitement au 5FU est illustrée à titre de comparaison. La diminution du pourcentage de cellules cyclantes induite par le traitement ou la perte d'expression de YAP est associée à un ralentissement significative de la prolifération des cellules 5F31 et ce dès 48h, sous traitement à la VP ou après utilisation du siARN ciblant YAP (**Figure n°29.C**).

2.2 Rôle de YAP dans l'acquisition de propriétés de cellules souches

Nous avons ensuite étudié l'influence de YAP sur l'expression du caractère souche de ces cellules en analysant d'une part la formation de sphères et d'autre part l'expression des marqueurs de CSC décrits dans la première partie des résultats. Nous avons étudié le panel de marqueurs connu comme étant exprimé plus fortement dans les cellules 5F31 comparées aux cellules parentales HT29 (ALDH1A3, CD44, CD133, Lgr5).

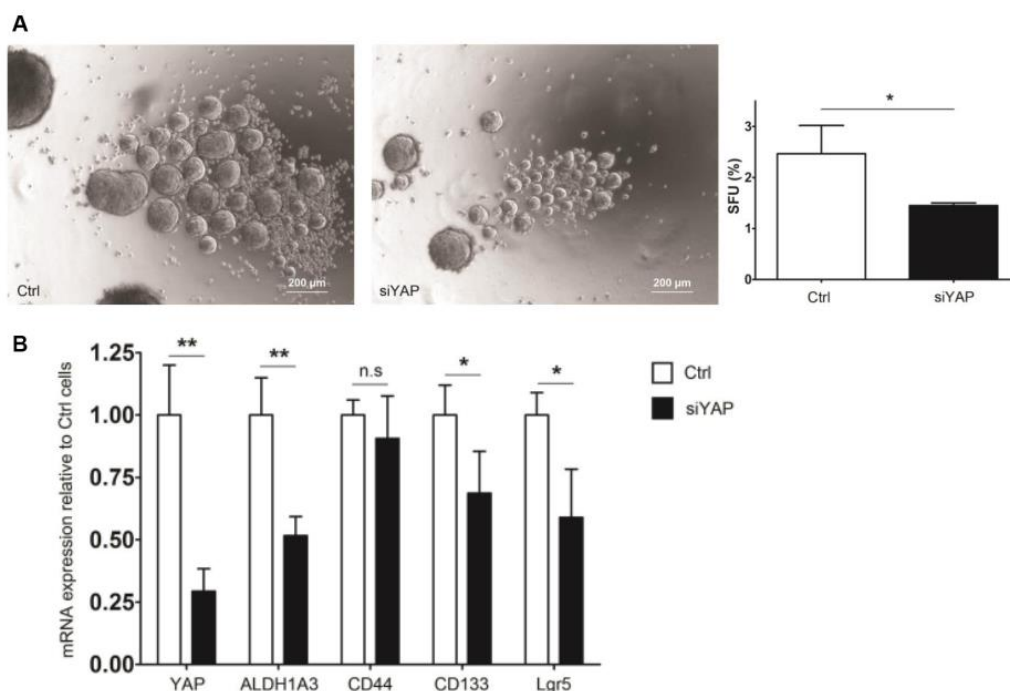


Figure n°30 : Diminution des propriétés et de l'expression de marqueurs de CSC après invalidation de YAP. A Clichés des sphères formées par les cellules 5F31 transfectées par les siCtrl ou siYAP et numération du nombre de sphères formées 1 semaine après ensemencement. Grossissement x20. **B** Expression des transcrits de YAP, ALDH1A3, CD44, CD133 et Lgr5 dans les cellules 5F31 transfectées par les siCtrl ou siYAP (expression 48 heures après transfection). n.s : non significatif. * : *p-value* < 0,05. ** : *p-value* < 0,01.

En condition de culture sans adhérence et en milieu appauvri, l'invalidation transitoire de l'expression de YAP dans le modèle 5F31 conduit à la diminution du nombre de sphères formées (d'un facteur deux comparativement aux cellules Ctrl); de plus, la taille des sphères formées est plus petite, ce qui est le reflet d'une prolifération cellulaire diminuée au sein de la sphère (**Figure n°30.A**). Comme visible sur ces résultats de RT-qPCR, l'inhibition de l'expression de YAP s'accompagne d'une diminution de l'expression d'un panel de gènes (ALDH1A3, CD133 et le Lgr5) associé aux cellules souches coliques saines ou tumorales (**Figure n°30.B**). Il a été décrit pour certains marqueurs, notamment le récepteur couplé aux protéines G Lgr5, que leur expression varie en fonction de leur état prolifératif (avec une association entre expression de Lgr5 et marquage Ki67). Le traitement de cellules souches colorectales Lgr5 positives à l'irinotecan inhibe de manière dynamique l'expression du Ki67 et du Lgr5, le retrait de la drogue conduisant à la réexpression des deux protéines (Kobayashi et al., 2012).

Ainsi, l'inhibition de YAP suivant deux méthodologies (inhibition pharmacologique ou par ARN interférent) dans le modèle 5F31 induit un ralentissement significatif de la prolifération en condition adhérente ou non adhérente, ainsi qu'une augmentation du *pool* de cellules quiescentes. Ceci conforte le caractère actif de YAP dans le maintien de la prolifération cellulaire. De plus, l'inhibition de YAP conduit à la diminution d'un panel de marqueurs décrits comme marqueurs de CSC de cette population chimiorésistante de cancer colorectal, suggérant un rôle de YAP dans l'expression du phénotype souche de ces cellules.

2.3 Transfection de YAP constitutivement actif et réponse à la chimiothérapie

Un autre volet de notre étude a consisté en l'étude de l'effet de la transfection d'un dominant constitutivement actif de YAP, présentant la substitution Ser127Ala le rendant donc insensible à la voie Hippo. Nous avons voulu savoir si la transfection de cette forme constitutivement active de YAP pouvait à l'inverse s'opposer à l'induction de quiescence sous 5FU observée dans les cellules 5F31. Nous avons choisi d'utiliser le plasmide du laboratoire du professeur K.L Guan (Université de San Diego), ce transgène possédant un *tag Flag* en N-terminal, permettant son identification, ainsi que deux domaines protéiques de type WW (un transcriptome des cellules 5F31 transfectées par ce dominant a été réalisé, les transcrits les plus différenciellement modulés figurant en Annexe 4 et 5 ; notons en particulier la forte

surexpression de gènes liés à la voie Hippo sans être décrit comme régulés directement par YAP : ANKRD1, AMOT, VGLL4, *etc*). Nous avons tout d'abord analysé l'efficacité de transfection stable des cellules 5F31 par le YAPdc (dominant constitutif, YAP^{S127A}) et le retentissement sur l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription TEAD.

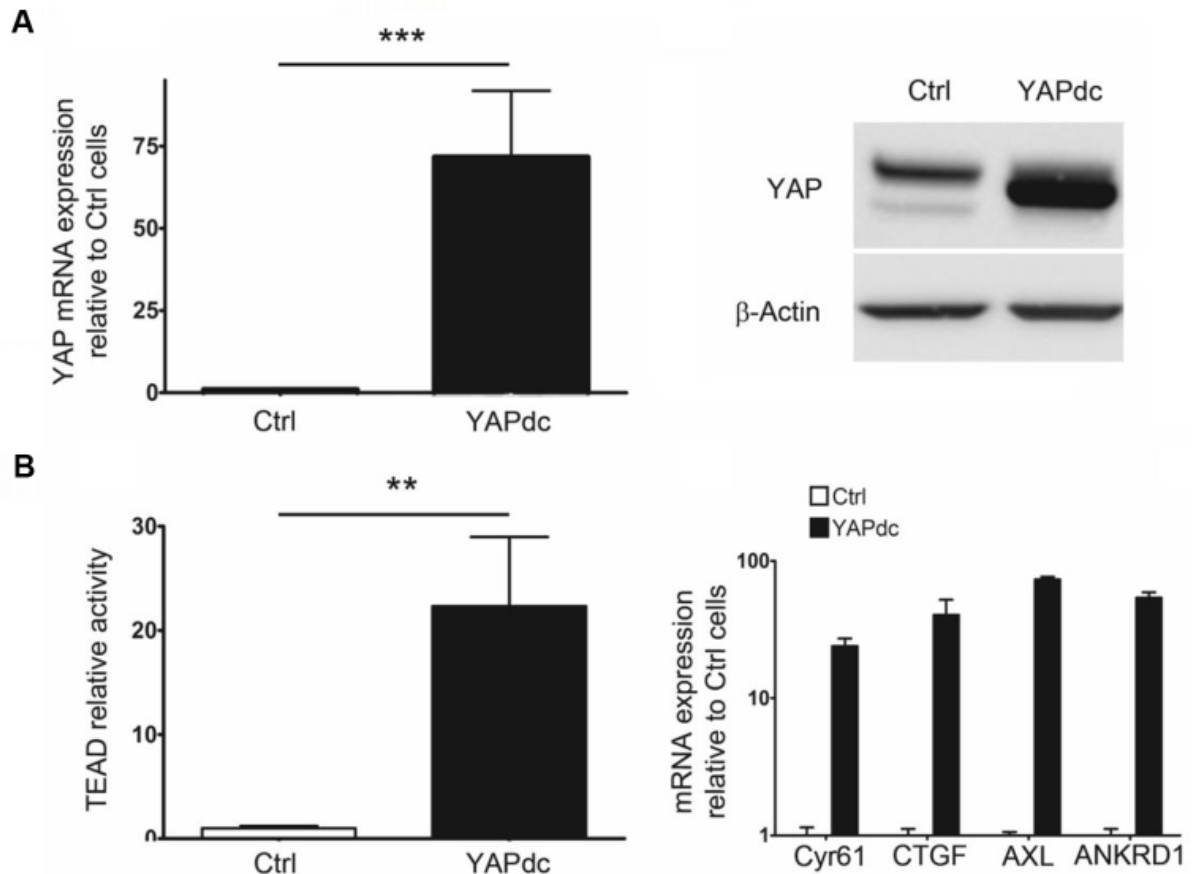


Figure n°31 : Expression d'un mutant constitutivement actif de YAP dans le modèle cellulaire 5F31. A Expression en ARNm ou protéique de YAP et de la β -Actine dans les cellules 5F31 Ctrl ou 5F31 YAPdc. **B** Activité des facteurs de transcription TEAD et expression des transcrits des gènes cibles de YAP/TEAD dans les modèles 5F31 Ctrl et 5F31 YAPdc. ** : *p-value* < 0,01. *** : *p-value* < 0,001.

Les résultats indiquent une bonne efficacité de transfection avec surexpression importante des transcrits et de la protéine YAP (**Figure n°31.A**). Les cellules 5F31 Ctrl (transfectées avec le vecteur vide) et 5F31 YAPdc ont été transfectées par le plasmide codant pour la luciférase sous la dépendance de 8 éléments de réponses TEAD. Comme visible sur la **Figure n°31.B**, la transfection stable du YAP^{S127A} dans les cellules 5F31 s'accompagne d'une activité transcriptionnelle 20 fois plus importante comparativement aux cellules 5F31 Ctrl (*p-value* < 0,01). De par l'analyse de la littérature et les données issues du transcriptome, nous

avons étudié l'expression d'un panel de gènes cibles des complexes YAP/TEAD (Cyr61, CTGF, AXL et ANKRD1). Les transcrits de ces quatre gènes sont retrouvés fortement surexprimés dans les 5F31 YAPdc comparativement aux cellules 5F31 Ctrl, validant notre modèle de surexpression de YAP (**Figure n°31.B**). Toutefois, nous observons que le transcrite le plus augmenté par la transfection du YAPdc dans les cellules 5F31 est l'Angiomotine AMOT (Annexe n°4). Nous avons voulu savoir si cette protéine jouait un rôle dans la régulation transcriptionnelle des cellules 5F31.

Régulation de l'expression de la protéine AMOT par YAP

La famille des Motines est décrite comme permettant la modulation de la voie Hippo, en étant activatrice ou inhibitrice en fonction des auteurs. Cependant peu d'études caractérisent les liens unissant ces différents acteurs au niveau transcriptionnel. Une étude récente montre (Couderc et al., 2016) cependant que l'expression d'AMOT-L1 est sous la dépendance de YAP dans des modèles de cancer du sein. Ces données, en accord avec les résultats obtenus de notre transcriptome, nous posent la question de savoir s'il n'existe pas un niveau de régulation supplémentaire entre les motines et YAP, rajoutant un niveau de complexité supplémentaire dans ce système. Nous avons voulu tout d'abord vérifier la surexpression d'AMOT au niveau protéique dans les cellules 5F31 surexprimant le dominant constitutivement actif de YAP.

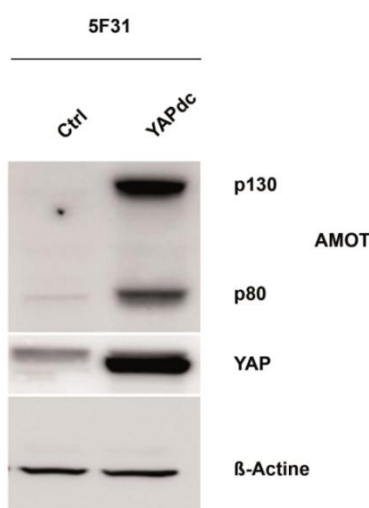


Figure n°32 : Expression des deux isoformes de l'Angiomotine dans les cellules 5F31 Ctrl ou transfectées par le YAPdc. Western blots d'AMOT (isoformes 80 et 130 kDa annotées), YAP et la β -Actine dans les cellules 5F31 Ctrl et YAPdc.

Dans nos modèles cellulaires, la surexpression de YAPdc est associée à une plus forte expression protéique des deux isoformes connus d'AMOT à 80 et 130 kDa (celle de 130 kDa interagissant physiquement avec YAP et TAZ par ses domaines PPxY), voire d'une néo-expression. La question dès lors est de savoir si la protéine AMOT participe ou s'oppose aux effets transcriptionnels dépendants de YAP dans le modèle 5F31. Pour cela, nous avons réalisé des transfections des cellules 5F31 YAPdc avec un siARN ciblant AMOT et étudié l'expression des gènes cibles de YAP/TEAD, AXL, Cyr61 et CTGF.

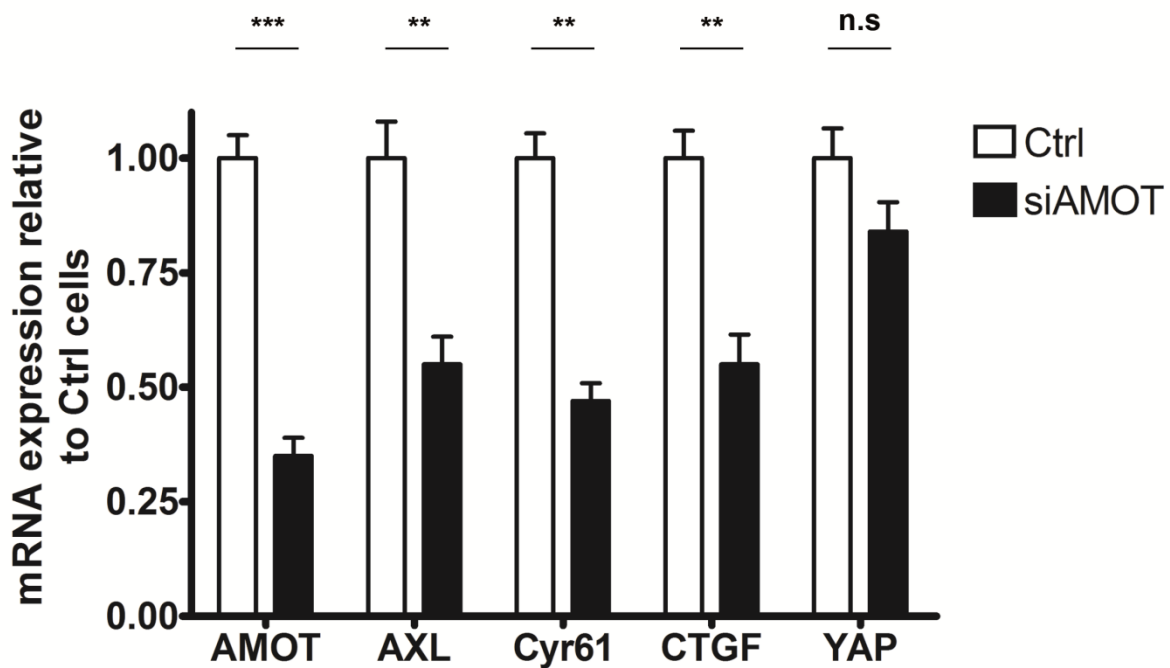


Figure n°33 : Expression des transcrits d'AMOT, AXL, CTGF, Cyr61 et YAP dans les cellules 5F31 YAPdc transfectées par le siCtrl ou le siAMOT. Les cellules 5F31 YAPdc ont été transfectées pendant 48 heures avant analyse par RT-qPCR de l'expression des transcrits cibles de YAP/TEAD et de l'Angiomotine. n.s : non significatif. ** : *p*-value < 0,01. *** : *p*-value < 0,001.

Après inhibition de l'expression de l'Angiomotine de plus de 60% dans les cellules 5F31 YAPdc, nous observons une diminution d'expression des gènes cibles de YAP/TEAD que sont Cyr61, CTGF et AXL en comparaison des cellules 5F31 YAPdc transfectées par le siCtrl. **Ces données plaident pour un rôle potentialisateur d'AMOT sur l'activité des complexes YAP/TEAD dans le modèle 5F31 YAPdc.**

Répercussion de la transfection du YAPdc sur les propriétés biologiques des cellules 5F31

Après avoir l'efficacité de transfection de YAP et son activité transcriptionnelle, la condition *sine qua none* avant d'analyser sa répercussion sur le cycle cellulaire est de s'assurer que la protéine issue du transgène est capable de rester nucléaire sous chimiothérapie. Pour cela nous avons réalisé des fractionnements nucléo-cytoplasmiques pour étudier la localisation subcellulaire de YAP, dans les cellules contrôles et YAPdc, traitées ou non par chimiothérapie.

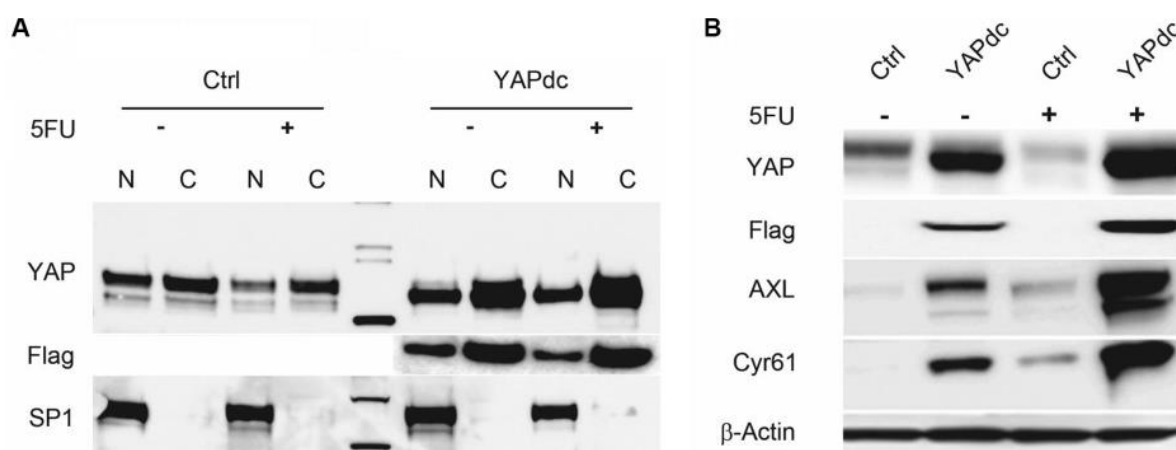


Figure n°34 : Expression et localisation subcellulaire de YAP sous chimiothérapie et expression des gènes cibles. **A** Fractionnement biochimique nucléocytoplasmique des cellules 5F31 Ctrl et YAPdc avec et sans traitement par le 5FU pendant 96 heures à 40 μ M. L'expression de YAP, du facteur de transcription SP1 et du Flag, reflet de l'expression du transgène est étudiée dans le Noyau (N) ou le cytoplasme des cellules (C). **B** Expression sur lysats totaux de YAP, du *tag* Flag, d'AXL, Cyr61 et de la β -Actine dans les cellules 5F31 Ctrl et YAPdc traitées ou non par le 5FU (40 μ M, 96 heures de traitement).

Le Western blot ayant suivi le fractionnement nucléo-cytoplasmique montre que l'expression du YAPdc est maintenue dans le noyau des cellules 5F31 YAPdc sous 5FU (**Figure n°34.A**). Ce blocage de YAP dans le noyau est associé à une expression plus importante des gènes cibles de YAP/TEAD tels que Cyr61 et AXL. A noter qu'indépendamment du YAPdc, ces protéines sont exprimées de manière plus importante sous 5FU dans les cellules 5F31 Ctrl malgré la diminution d'expression totale et nucléaire de YAP, suggérant l'existence sous chimiothérapie de mécanismes de régulation YAP indépendants (**Figure n°34.B**).

Après avoir décrit et caractérisé nos modèles cellulaires, l'étape suivante était d'étudier la répercussion de ce blocage de YAP dans le noyau des cellules 5F31 sur la réponse au 5FU, en particulier sur l'induction de quiescence cellulaire. Nous avons étudié le pourcentage de cellules quiescentes ainsi que le potentiel de chimiorésistance par utilisation de tests MTT et de clonogénicité.

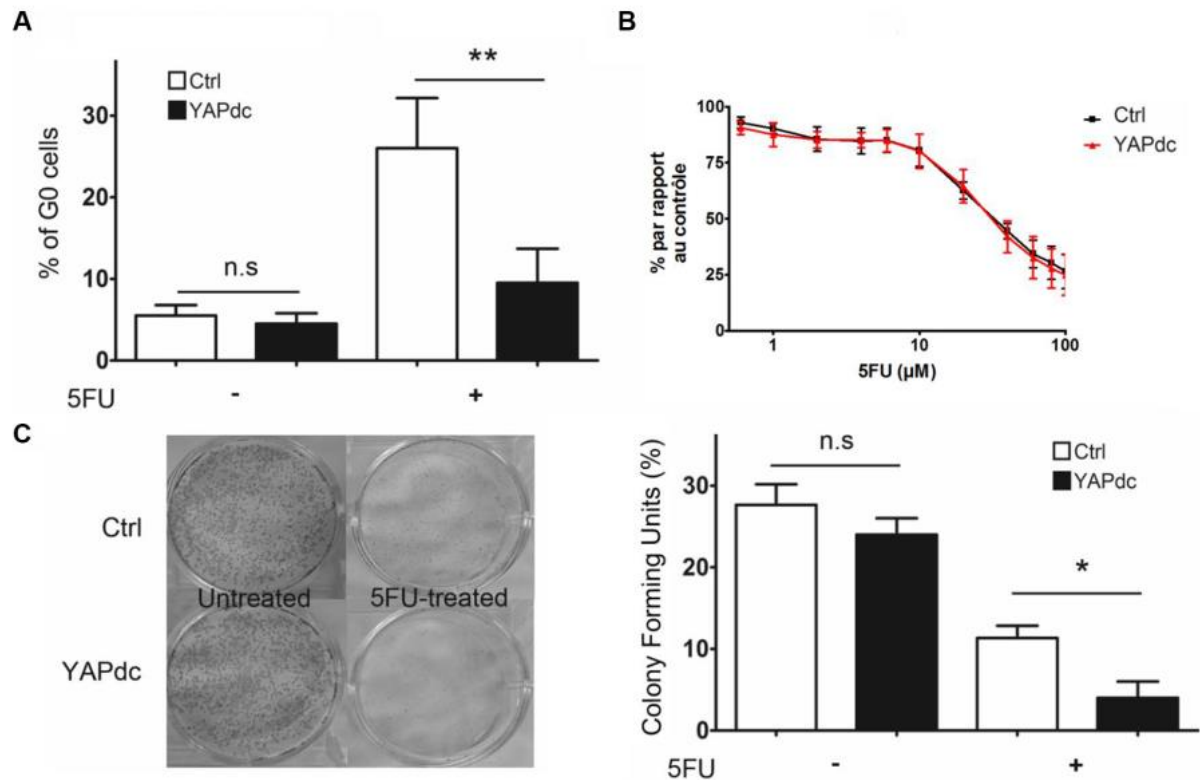


Figure n°35 : Impact du blocage de YAP dans les cellules 5F31 sous chimiothérapie sur le cycle cellulaire et la survie cellulaire. **A** Analyse en cytométrie de flux du pourcentage de cellules quiescentes entre les cellules 5F31 Ctrl et YAPdc traitées ou non par le 5FU (40 µM, 96 heures). **B** Test de cytotoxicité avec une gamme de 5FU de 0,6 à 100 µM de 5FU ; l'ordonnée représente le pourcentage de cellules comparativement au contrôle non traité. **C** Clichés de colonies formées par les cellules 5F31 Ctrl et YAPdc prétraitées ou non par le 5FU (40 µM, 96 heures). Les colonies ont été fixées 2 semaines après ensemencement et comptées pour calculer le *Colony Forming Unit* (% de colonies formées / nombre de cellules ensemencées). n.s : non significatif * : p -value < 0,05. ** : p -value < 0,01.

Les résultats montrent que la fraction de cellules quiescentes des cellules 5F31 YAPdc traitées par le 5FU est significativement plus faible par rapport aux cellules contrôles traitées par le 5FU ($9,5 \pm 4,2$ versus $26,1 \pm 6,2$ %, p -value < 0,01). Ainsi, YAP s'oppose à l'entrée en quiescence lorsque les cellules sont traitées par chimiothérapie (**Figure n°35.A**).

L'induction de quiescence étant associée dans la littérature à une absence de réponse aux agents cytostatiques ou cytotoxiques ciblant uniquement les cellules en prolifération (Graham, 2002), nous nous sommes interrogés sur l'effet du YAPdc sur le potentiel de chimiorésistance et les capacités de survie des cellules 5F31. Des tests de cytotoxicité en MTT ne montrent pas de variation à court terme de la surexpression du YAPdc quant à la réponse au 5FU (**Figure n°35.B**). Nous avons ensuite analysé la survie des cellules après traitement, en réalisant des tests de formation de colonies des populations cellulaires 5F31 Ctrl et YAPdc. Les cellules ont été ensemencées à faible densité en plaque 6 puits et après deux semaines, nous avons compté les colonies formées pour les 4 conditions (5F31 Ctrl et YAPdc, prétraitées ou non 96 heures par le 5FU). **Il apparaît qu'après traitement, les cellules 5F31 YAPdc ont un potentiel clonogénique plus faible que les 5F31 Ctrl**, permettant de suggérer un lien entre l'induction de quiescence et la survie cellulaire (**Figure n°35.C**).

Par ces deux approches d'inactivation ou de surexpression, nous avons pu confirmer le rôle actif de la YAP sur la balance prolifération/quiescence des cellules 5F31.

2.4 Cibles fonctionnelles de YAP impliquées dans l'induction de quiescence

Pour comprendre le rôle de YAP sur le cycle cellulaire, nous avons analysé l'expression de régulateurs du cycle cellulaire. Nous avons étudié la variation de l'expression du facteur de transcription c-Myc et des cyclines A et E1 dans les populations cellulaires HT29, 5F7 et 5F31 traitées ou non au 5FU (dose de traitement de deux fois l'IC₅₀).

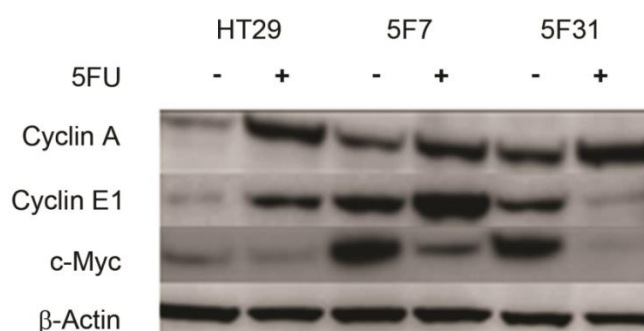


Figure n°36 : Expression des régulateurs du cycle cellulaire Cyclines A, E1, c-Myc dans les cellules HT29 et ses clones chimiorésistants traitées ou non au 5FU. Expression des protéines Cycline A, Cycline E1, c-Myc et β-Actine dans les lysats des cellules HT29, 5F7 et 5F31 traitées pendant 96 heures ou non au 5FU respectivement à 2,4 et 40 μM.

Les Western blots de la **Figure n°36** montrent une variation similaire dans l'expression de c-Myc et de la Cycline A sous chimiothérapie pour les cellules bloquées en phase S (HT29 et 5F7) et les cellules entrant en quiescence (5F31). A l'inverse, la Cycline E1 s'accumule dans les cellules bloquées en phase S alors qu'à l'inverse son expression est perdue dans les cellules 5F31 quiescentes. Rappelons que cette cycline est connue pour jouer un rôle dans la progression de la phase G1 vers la phase S ; nous avons cherché à savoir si l'inhibition de YAP induisait la perte d'expression de cette cycline particulière.

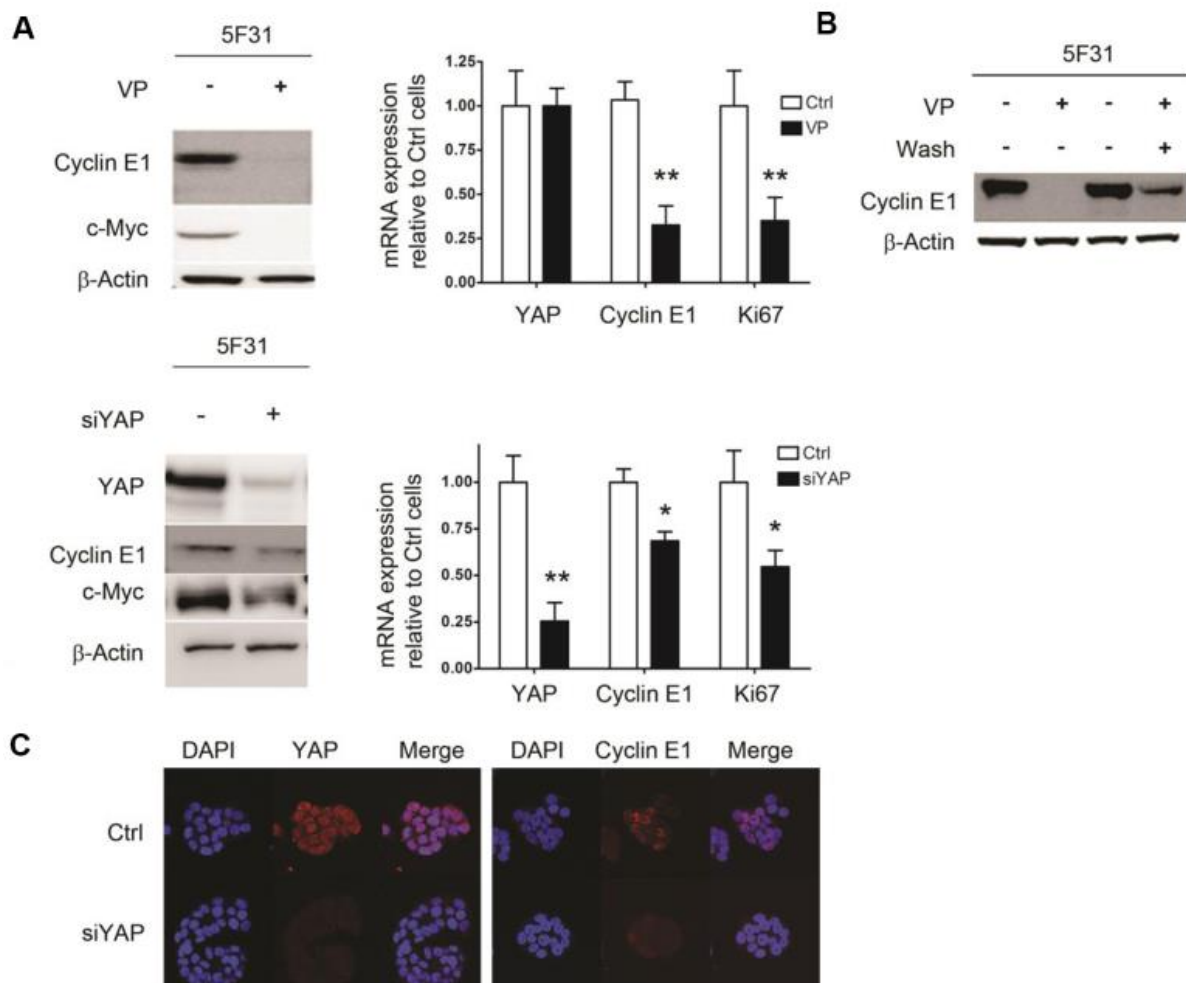


Figure n°37 : Perte de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire dans les cellules 5F31 après traitement par VP ou siARN ciblant YAP. **A** Expression des transcrits de YAP, Cycline E1 et Ki67 ou expression protéique de YAP, Cycline E1, c-Myc et β -Actine dans les cellules 5F31 traitées 48h à la VP (10 μ M) ou après 48 heures de transfection par les siARNs anti-YAP. **B** L'expression de la Cycline E1 est étudiée dans des cellules 5F31 après traitement de 48h à la VP suivi de 4 jours de sevrage. **C** Localisation subcellulaire de la cycline E1 dans les cellules 5F31 transfectées ou non par le siYAP. Grossissement x63. * : *p-value* < 0,05. ** : *p-value* < 0,01.

Les résultats de la **Figure n°37** montrent que l'inhibition pharmacologique de YAP par traitement à la VP ou l'inhibition de son expression par siARN conduit à la perte

d'expression des ARNm de la cycline E1, du Ki67 ainsi que la perte d'expression des protéines correspondantes (ainsi que du facteur de transcription c-Myc), en western blot (**Figure n°37.A**) ou en Immunofluorescence (**Figure n°37.B**).

Nous avons pu observer que la diminution d'expression de la Cycline E1 est transitoire puisque lorsque le milieu est sevré en VP, les cellules retournent en prolifération et ré-expriment cette Cycline, illustrant ce caractère réversible de la quiescence (**Figure n°37.C**). Ainsi, l'inhibition de YAP induit la perte d'expression de la Cycline E1, de c-Myc et du Ki67, marqueurs de prolifération ; cette signature moléculaire est comparable avec celles des cellules 5F31 traitées par le 5FU entrant en quiescence.

2.5 Extension du rôle de YAP et de son paralogue TAZ sur les propriétés tumorales des lignées de CCR

Nos données ont montré que la perte d'expression de YAP induit l'entrée en quiescence pour le modèle cellulaire 5F31, avec perte d'expression des marqueurs Cycline E1, c-Myc et Ki67. La question dès lors est de savoir si cette régulation par YAP de la balance entre la prolifération et la quiescence cellulaire peut s'appliquer à d'autres modèles cellulaires. Au préalable, nous avons étudié le statut de YAP et de son paralogue TAZ dans plusieurs lignées de cancers colorectaux.

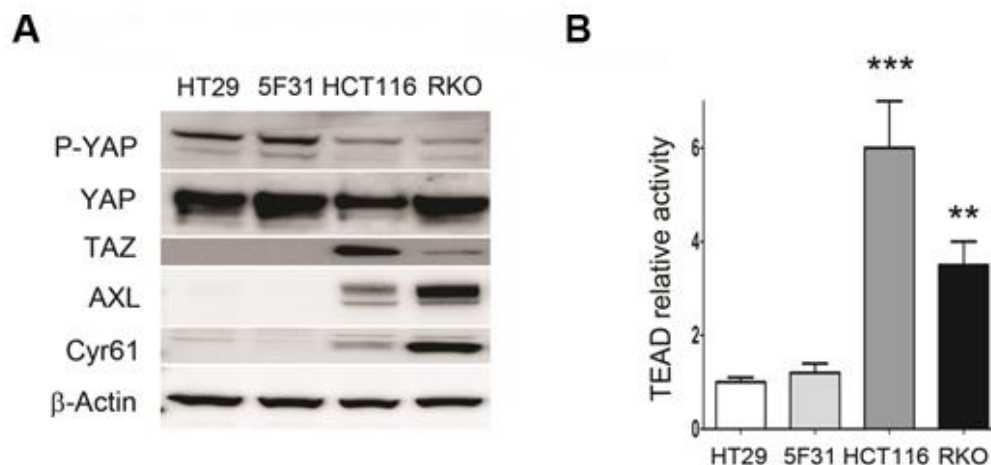


Figure n°38 : Expression de YAP/TAZ, de leurs gènes cibles et activité transcriptionnelle des facteurs de transcription TEAD dans les lignées de cancer colorectaux HT-29, HCT116 et RKO et le modèle cellulaire chimiorésistant 5F31. A Expression protéique de YAP, P-YAP (Ser127), TAZ, AXL, Cyr61 et la β -Actine dans les cellules HT29, 5F31, HCT116 et RKO en phase de prolifération. **B** Activité par test rapporteur des facteurs de transcription TEAD dans les lignées HT-29, 5F31, HCT116 et RKO. **: *p-value* < 0,01. ***: *p-value* < 0,001.

Deux conclusions pouvaient être tirées de ces résultats : les lignées HCT116 et RKO expriment le paralogue de YAP qu'est TAZ (alors que TAZ est indétectable tant au niveau protéique qu'au niveau de transcrit dans les lignées HT29 et le clone chimiorésistant 5F31, les données des transcrits n'étant pas représentées). De plus, le niveau de phosphorylation basal de YAP sur le résidu Ser127 est plus faible dans les lignées HCT116 et RKO (**Figure n°38.A**). Ces deux informations nous permettent d'expliquer que les cellules RKO et HCT116 expriment d'emblée de manière plus importante les gènes cibles des complexes YAP/TAZ/TEAD que sont Cyr61 et AXL et présentent une activité transcriptionnelle des facteurs TEAD plus importante (en comparaison avec la lignée cellulaire HT29, **Figure n°38.B**).

2.6 Modulation de la balance prolifération/quiescence par YAP/TAZ

Nous avons commencé par traiter les cellules HCT116 avec la VP (jusqu'à 5 μ M pendant 48 heures pour avoir une cytotoxicité inférieure à 5%). Nous avons étudié l'activité transcriptionnelle des facteurs TEAD, l'expression des protéines Cycline E1 et c-Myc ainsi que le pourcentage de cellules quiescentes dans ces différentes conditions.

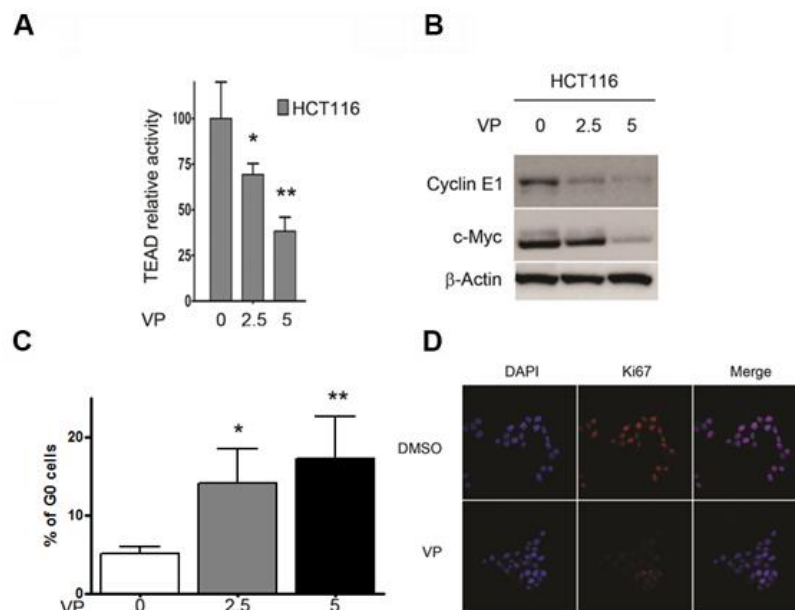


Figure n°39 : L'inhibition pharmacologique de YAP est associée avec l'induction de quiescence dans le modèle HCT116. **A** Activité transcriptionnelle des facteurs de transcription TEAD mesurée chez les HCT116, traitées par une gamme de VP (0, 2,5 et 5 μ M pendant 48 heures). **B** Expression protéique de la Cycline E1, c-Myc et la β -Actine chez les HCT116, traitées par une gamme de VP (0, 2,5 et 5 μ M pendant 48 heures). **C** Pourcentage de cellules quiescentes des cellules HCT116 traitées une gamme de VP (0, 2,5 et 5 μ M pendant 48 heures) par cytométrie de flux. **D** Immunofluorescence

sur cellules HCT116 traitées ou non par la VP (5 μ M, 48 heures) puis marquage du KI67 et contre-marquage des noyaux au DAPI. Grossissement x63. * : *p-value* < 0,05. ** : *p-value* < 0,01.

Comme pour les cellules 5F31, le traitement des cellules HCT116 par la VP conduit à la diminution de l'activité transcriptionnelle des protéines TEAD (près de 30% de diminution dès 2,5 μ M, *p-value* < 0,05) et la perte d'expression protéique de C-Myc et de la Cycline E1 (Figures n°39 A et B). Ceci est associé avec l'induction de quiescence, confirmée en immunofluorescence par la perte d'expression nucléaire du Ki67 et en cytométrie en flux (Figure n°39 C et D). Nous avons ensuite traité les cellules par des siARNs ciblant YAP et TAZ, isolément ou en simultané.

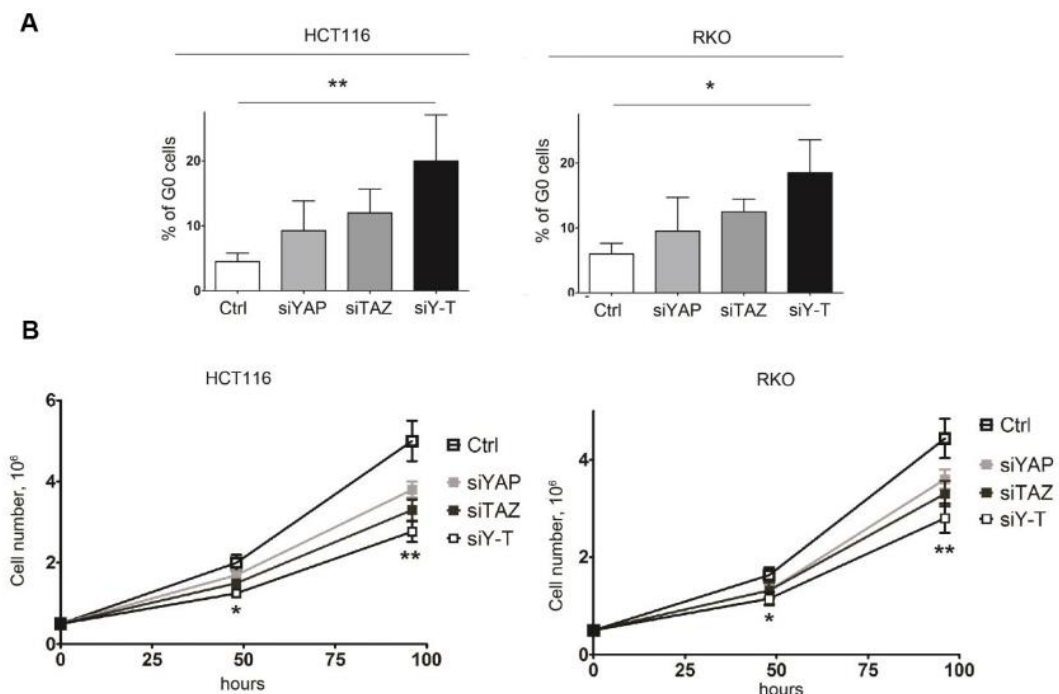


Figure n°40 : Induction de quiescence par l'inactivation de YAP/TAZ dans les lignées HCT116 et RKO. **A** Les cellules RKO et HCT116 ont été transfectées avec les siARN ciblant YAP, TAZ et les deux en simultané puis le cycle cellulaire et la fraction de cellules quiescentes a été mesurée par cytométrie en flux. **B** La prolifération cellulaire est mesurée 48 heures et 96 heures post-transfection. * : *p-value* < 0,05. ** : *p-value* < 0,01.

L'inhibition de YAP et TAZ dans les lignées cellulaires HCT116 et RKO est associée à l'augmentation significative de la fraction de cellules quiescentes (passant de $4,44 \pm 1,1$ % à $20,5 \pm 7,2$ % pour les HCT116, et de $6,1 \pm 1,8$ % à $18,9 \pm 5,1$ % pour les RKO avec la combinaison de siYAP et siTAZ, *p-values* respectivement inférieures à 0,01 et 0,05, **Figure n°40.A**). Cette induction de quiescence s'accompagne d'un fort ralentissement de la

prolifération de ces deux populations cellulaires (ralentissement significatif dès 48 heures après transfection, p -value < 0,05 pour les deux populations), sans induction de mort significative (mesurée en cytométrie en flux, **Figure n°40.B**).

Après avoir observé une augmentation du pourcentage de cellules quiescentes en réponse à l'invalidation de l'expression de YAP et TAZ dans les lignées RKO et HCT116, nous avons analysé l'expression des marqueurs de prolifération dont l'expression est modifiée dans les cellules 5F31 traitées à la VP ou avec les siARN ciblant YAP au niveau transcriptionnel et protéique, soit la Cycline E1 et c-Myc.

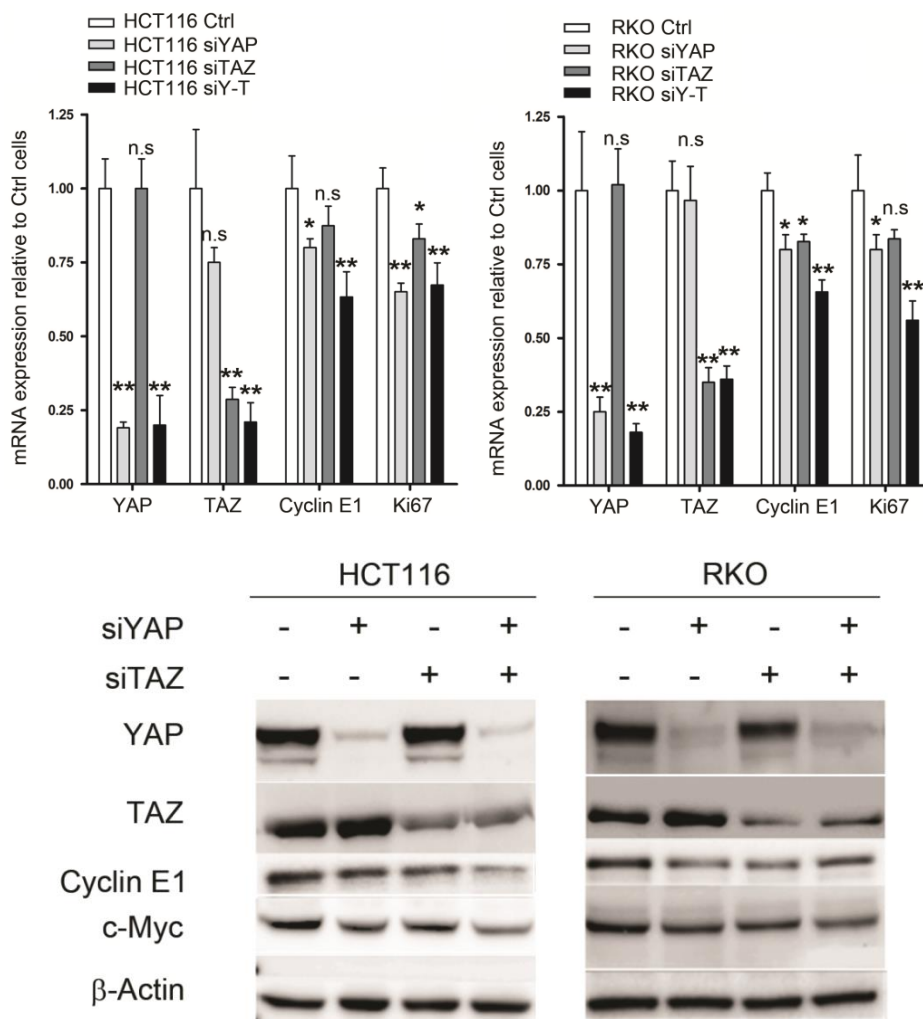


Figure n°41 : L'invalidation de YAP/TAZ induit la diminution de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire Cycline E1 et c-Myc. Expression protéique ou des transcrits de YAP, TAZ, Cycline E1, c-Myc et la β -Actine dans les cellules HCT116 et RKO 48 heures après transfection avec le siCtrl, le siYAP, le siTAZ ou les deux siARN en simultané. n.s : non significatif. * : p -value < 0,05. ** : p -value < 0,01.

L'invalidation de YAP et TAZ dans les modèles cellulaires HCT116 et RKO conduit à la diminution significative de l'expression des transcrits et des protéines de la Cycline E1 et de c-Myc. Ainsi, l'inhibition pharmacologique, l'invalidation de YAP dans les modèles 5F31 ou de YAP/TAZ dans les modèles HCT116 et RKO entraîne l'induction de quiescence avec diminution de la quantité de Cycline E1 et de c-Myc.

La question sous-jacente des données précédentes est de savoir si la Cycline E1 peut être un effecteur final de YAP/TAZ dans la régulation entre la prolifération et la quiescence cellulaire. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé des siARNs ciblant spécifiquement la Cycline E1 dans nos trois modèles cellulaires et mesuré la fraction de cellules quiescentes et la prolifération cellulaire après transfection.

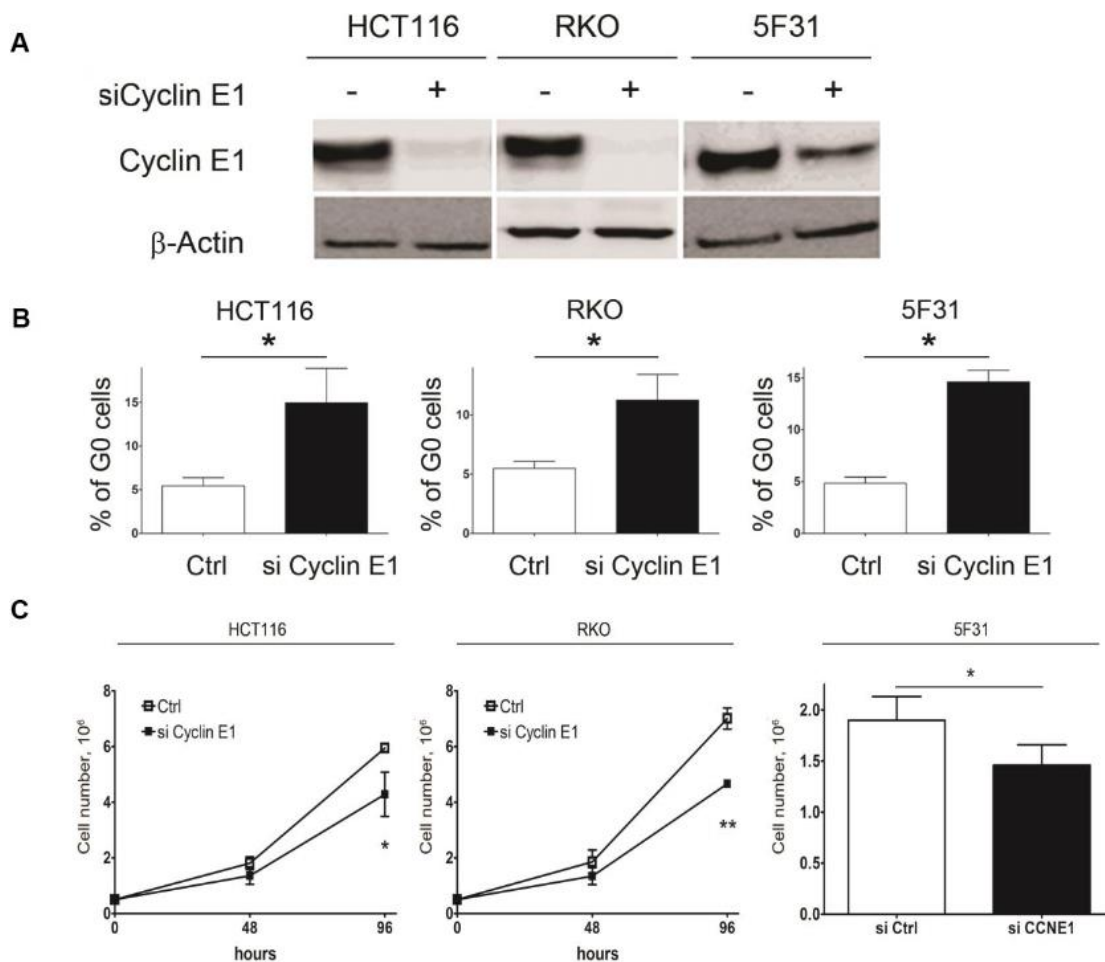


Figure n°42 : Répercussion de l'inhibition de la Cycline E1 sur le cycle cellulaire des cellules 5F31, HCT116 et RKO. **A** Expression protéique de la Cycline E1 et de la β-Actine dans les cellules 5F31, HCT116 et RKO après 48 heures de transfection avec le siCtrl ou le siARN ciblant la Cycline E1. **B** Mesure du pourcentage de cellules quiescentes par cytométrie en flux après 48 heures de transfection avec le siCtrl ou le siARN ciblant la Cycline E1. **C** Mesure de la prolifération cellulaire sur les trois populations cellulaires. * : p -value < 0,05. ** : p -value < 0,01.

L'inhibition de l'expression de la Cycline E1 par siARN (**Figure n°42.A**), efficace dans les trois lignées cellulaires, est associée au ralentissement de la prolifération cellulaire dans les trois modèles cellulaires (entre 23 % et 32 % de cellules en moins à 48 heures post transfection) et à l'augmentation de la fraction de cellules quiescentes (**Figure n°42.B**). Ces éléments nous permettent de proposer **la Cycline E1 comme l'un des effecteurs terminaux de YAP/TAZ dans la régulation du cycle cellulaire dans le cancer colorectal**.

2.7 Modulation des propriétés invasives par YAP et TAZ

Les protéines YAP et TAZ sont décrites comme modulant les propriétés de migration et d'invasion des cellules tumorales. Nous nous sommes intéressés à ces propriétés et aux potentiels effecteurs dont l'expression est régulée par les protéines YAP/TAZ. Pour commencer, nous avons étudié les propriétés invasives des différentes populations cellulaires utilisées, afin de voir si l'activité TEAD peut être associée à un potentiel invasif exacerbé.

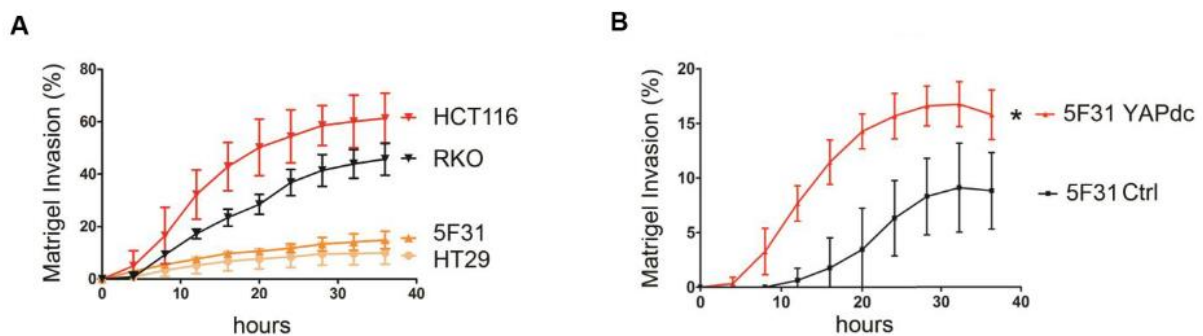


Figure n°43 : Potentiel invasif des différentes lignées cellulaires de cancers colorectaux. A Mesure de l'invasion progressive d'une blessure remplie de Matrigel® par les différentes lignées cellulaires (HT29, 5F31, RKO, HCT116) en fonction du temps. L'invasion est exprimée en pourcentage de blessure remplie. **B** Mesure de l'invasion progressive d'une blessure remplie de Matrigel® par les cellules 5F31 Ctrl et 5F31 YAPdc. * : *p-value* < 0,05.

Les lignées ayant une forte activité intrinsèque TEAD dépendante (RKO, HCT116) présentent un potentiel invasif en matrice de Matrigel® plus important que la lignée HT29 et que le clone chimiorésistant 5F31, résultats allant dans le sens de l'implication du complexe YAP/TEAD et TAZ/TEAD dans les propriétés invasives (**Figure n°43.A**). De plus, la surexpression du YAPdc dans le modèle 5F31 induit l'augmentation significative du phénotype invasif de ces cellules, confortant le lien entre activité YAP/TAZ élevée et potentiel invasif (**Figure n°43.B**). Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets induits sur l'invasion par : 1- un traitement à la VP des deux lignées cellulaires et 2- la transfection des siARNs ciblant YAP et TAZ, sur les lignées HCT116 et RKO.

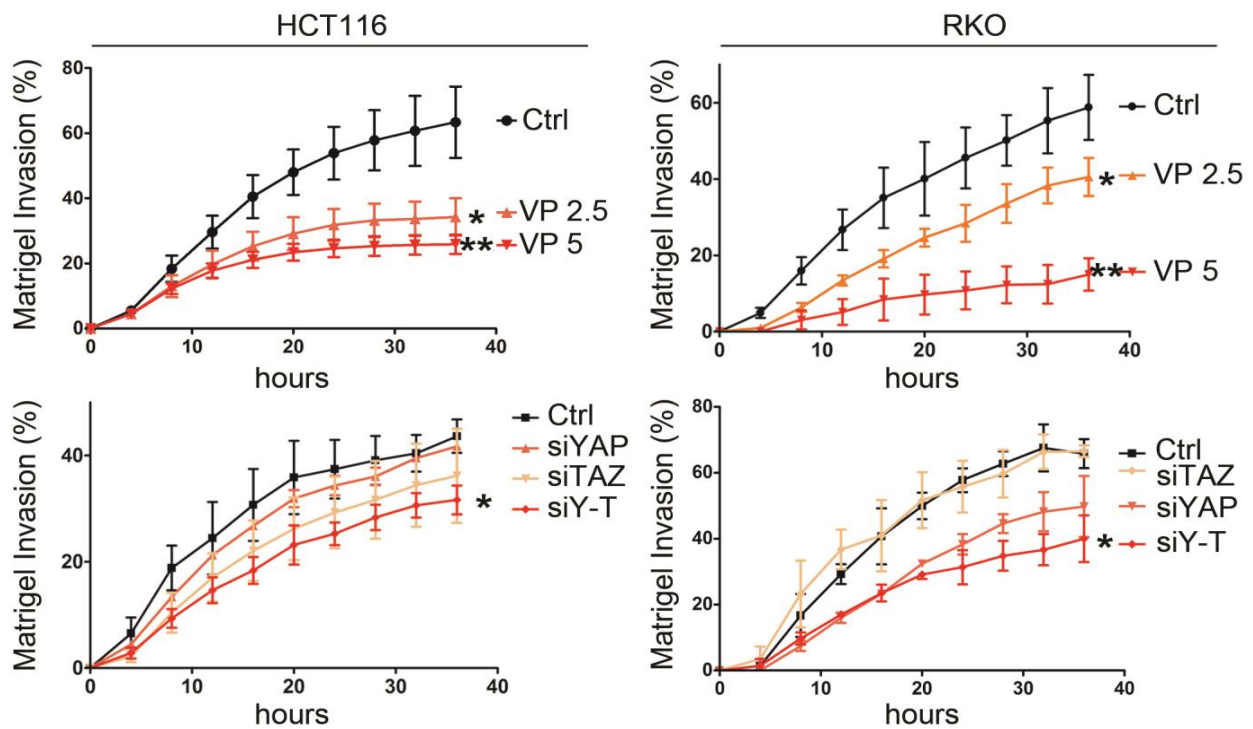


Figure n°44 : Potentiel invasif des lignées de CCR HCT116 ou RKO après modulation de YAP/TAZ. Mesure de l'invasion progressive d'une blessure remplie de Matrigel® par les différentes lignées cellulaires (HT29, 5F31, RKO, HCT116) en fonction du temps. Les cellules sont traitées par une gamme de VP (0 à 5 μ M pendant la mesure de la progression des cellules dans le Matrigel® ou ont été transfectées pendant l'ensemencement avec les siARN Ctrl, YAP, TAZ ou les deux). * : *p-value* < 0,05. ** : *p-value* < 0,01.

Le traitement par la VP ou l'inhibition de l'expression de YAP/TAZ induit une diminution significative du potentiel invasif des lignées HCT116 et RKO. Dès lors, nous avons recherché quelles cibles de YAP/TAZ sont impliquées dans ces propriétés. Dans la littérature, le récepteur à activité tyrosine kinase AXL et la protéine matricielle Cyr61 sont décrits comme influant l'invasion métastatique et la dissémination tumorale (Leconet et al., 2014)(Dunne et al., 2014)(Monnier et al., 2008). Nous avons analysé l'expression protéique de ces acteurs dans les lignées HCT116 et RKO dans les différentes conditions de culture établies ci-dessus.

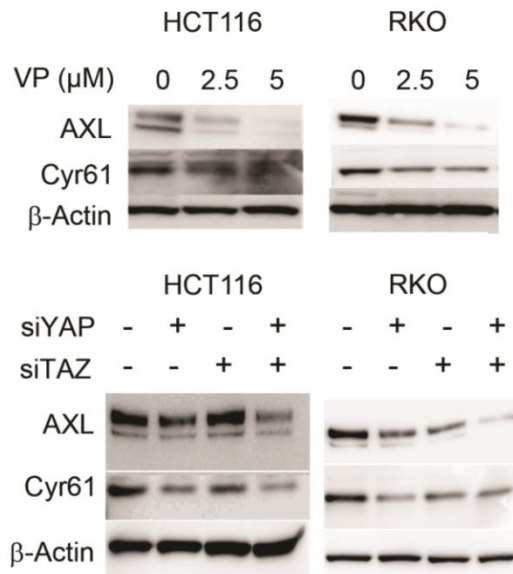
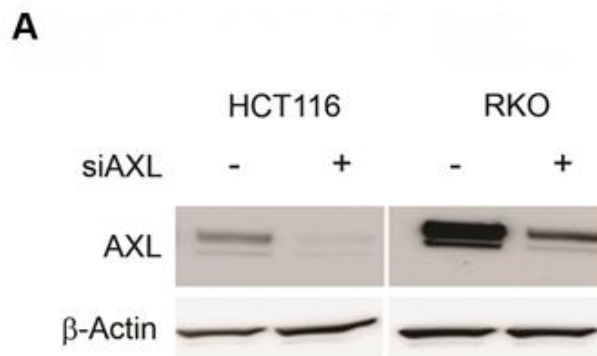


Figure n°45 : Expression des protéines cibles de YAP/TAZ en réponse aux siARNs et à la VP. Les cellules HCT116 et RKO ont été traitées pendant 48 heures à la VP (0, 2,5 ou 5 μM) ou transfectées par les siARNs Ctrl, YAP, TAZ ou YAP et TAZ avant récupération des protéines totales. Expression protéique d'AXL, de Cyr61 et de la β-Actine.

L'inhibition de YAP/TAZ dans les lignées fortement invasives HCT116 et RKO est associée à une diminution d'expression des protéines AXL et Cyr61. La question reste de savoir si l'un de ces acteurs dont l'expression est régulée par YAP/TAZ joue un rôle dans le potentiel invasif de ces lignées cellulaires.

Des études par siARN ciblant spécifiquement Cyr61 ou AXL ont été réalisées. Les résultats concernant l'inactivation du Cyr61 n'étaient pas significatifs sur l'invasion des cellules, ils ne sont pas représentés pour un souci de clarté. Sont représentés dans la figure les résultats obtenus avec les siARNs ciblant spécifiquement AXL.



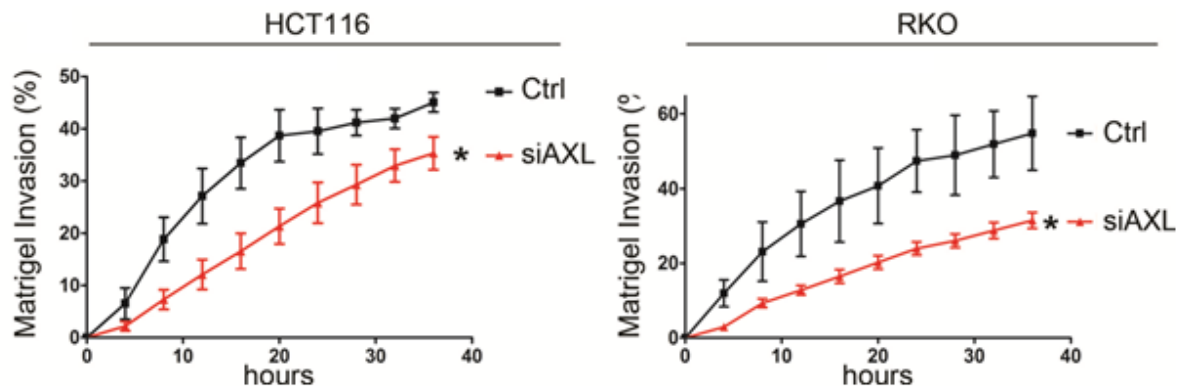
B

Figure n°46 : L'inhibition de l'expression d'AXL conduit à la diminution du phénotype invasif des lignées HCT116 et RKO. A Expression d'AXL et de la β -Actine dans les lignées HCT116 et RKO transfectées par le siCtrl ou siAXL. **B** Mesure de l'invasion progressive d'une blessure remplie de Matrigel[®] dans les mêmes conditions expérimentales. * : p -value < 0,05.

L'inhibition seule de l'expression du récepteur à activité tyrosine kinase AXL inhibe le potentiel invasif des lignées HCT116 et RKO, **faisant de ce récepteur l'un des effecteurs terminaux de YAP/TAZ dans la régulation des propriétés d'invasion des cellules tumorales coliques en matrice de Matrigel.** Le ciblage thérapeutique d'AXL est décrit depuis quelques années, avec mise au point d'inhibiteurs spécifiques (R428) ou d'anticorps thérapeutiques (Leconet et al., 2014). Cependant, la recherche d'inhibiteurs spécifiques des complexes YAP/TAZ/TEAD régulant à la fois les propriétés prolifératives et invasives des cellules cancéreuses semble plus appropriée que de cibler l'un de leurs nombreux effecteurs protéiques.

2.8 Dominant constitutif de YAP et blocage de l'entrée en quiescence

Après avoir démontré que le transgène YAP^{S127A} est capable de forcer les cellules 5F31 à demeurer en cycle lors de l'exposition au 5FU, nous avons voulu savoir quels mécanismes moléculaires pouvaient être mobilisés dans ces cellules.

Nous avons choisi de réaliser une étude systématique par l'utilisation de *Phosphokinase-array* permettant d'explorer le niveau de phosphorylation d'une quarantaine de voies de signalisation intracellulaire. Nous avons comparé 4 conditions : les cellules 5F31 Ctrl et 5F31 YAPdc, non traitées ou traitées par le 5FU pendant 96 heures.

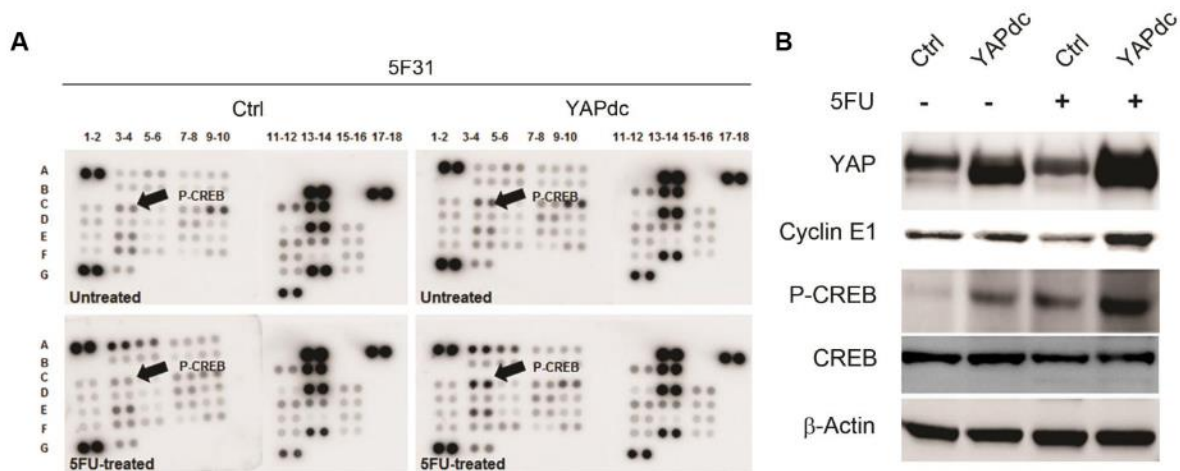


Figure n°47 : Activation soutenue de CREB dans le modèle cellulaire 5F31 sous 5FU. A Clichés du Phosphoarray réalisé avec les lysats cellulaires des cellules 5F31 Ctrl et YAPdc traitées ou non au 5FU pendant 96 heures (40 μ M). **B** Expression protéique de YAP, Cycline E1, P-CREB Ser133, CREB et β -Actine dans les mêmes conditions expérimentales.

La différence majeure observée sur le *Phosphokinase-array* est l'augmentation de la forme phosphorylée du facteur de transcription CREB. Cette augmentation se retrouve à deux niveaux ; d'une part, la transfection du YAPdc induit l'augmentation de son niveau de phosphorylation, d'autre part le traitement par le 5FU induit une activation de CREB dans les cellules 5F31 Ctrl et YAPdc, bien que le niveau d'activation soit le plus élevé pour les 5F31 YAPdc (**Figure n°47.A**). Les différences d'activation de CREB ont été confirmées par Western blot dans les mêmes conditions (**Figure n°47.B**).

La protéine CREB (*cAMP Response Element Binding protein*) est décrite comme permettant la prolifération cellulaire et l'expression des transcrits de plusieurs cyclines ; de plus, des études globales par *ChiP-on Chip* ont montré que l'activation de CREB par traitement à la Forskoline (permettant l'augmentation de l'AMPc intracellulaire) induit la fixation de CREB sur le promoteur de la Cycline E1 (Impey et al., 2004). Pour analyser le rôle potentiel de CREB dans le maintien de la prolifération cellulaire et l'expression de la Cycline E1, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique de l'interaction entre CREB et son co-activateur CBP, le KG-501 (Best et al., 2004). Les cellules 5F31 Ctrl et YAPdc ont été traitées ou non au KG-501, en présence ou non du 5FU et nous avons étudié le niveau d'expression des gènes cibles de YAP/TEAD et la Cycline E1 ainsi que la répercussion de cet inhibiteur sur l'induction de quiescence sous 5FU.

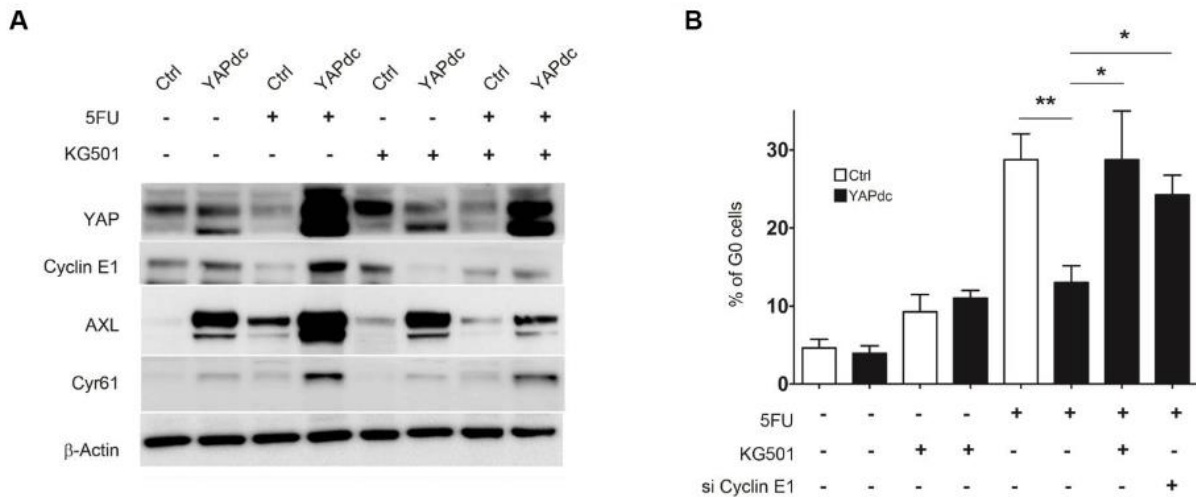


Figure n°48 : Implication de CREB dans le maintien des cellules 5F31 YAPdc en prolifération sous 5FU. A Western blots de YAP, Cycline E1, AXL, Cyr61 et β -Actine sur lysats des cellules 5F31 Ctrl et YAPdc traitées ou non au 5FU (40 μ M pendant 96 heures) avec ou sans traitement au KG-501 (20 μ M, traitement sur les 48 dernières heures de traitement au 5FU). **B** Quantification du pourcentage de cellules quiescentes des cellules 5F31 Ctrl ou YAPdc après traitement au 5FU et/ou au KG501 ainsi qu'après transfection par un siARN ciblant la Cycline E1. * : p -value < 0,05. ** : p -value < 0,01.

Le traitement par le KG-501 induit une diminution d'expression de la Cycline E1 dans les cellules 5F31 YAPdc traitées par le 5FU. Cette diminution s'accompagne également d'une diminution de l'expression des protéines AXL et Cyr61, protéines médiant l'invasion tumorale (**Figure n°48.A**). Lors de l'analyse du cycle cellulaire, nous pouvons observer que le traitement au KG-501 permet de contrecarrer les effets dépendants du transgène YAP^{S127A} sur l'inhibition de l'induction de quiescence ; les cellules traitées au KG-501 retrouvent un pourcentage de cellules quiescentes équivalentes aux cellules 5F31 Ctrl sous chimiothérapie (**Figure n°48.B**).

Ces données permettent donc d'affirmer que CREB joue un rôle de médiateur important dans les effets dépendants de YAP, via notamment l'expression de la Cycline E1. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour analyser la régulation directe ou indirecte de la Cycline E1 par CREB.

2.9 Dégradation de la protéine YAP sous 5FU

Les études au niveau ARN n'avaient pas montré de diminution de l'expression des transcrits de YAP sous 5FU dans le modèle 5F31. Ainsi, la perte d'expression protéique de YAP (nucléaire et totale) dans le modèle cellulaire 5F31 pouvait s'expliquer par des

mécanismes de dégradation, notamment par une voie protéosomale (voie la plus décrite faisant intervenir notamment la β -Trcp) ou une voie lysosomale dépendante des mécanismes de l'autophagie (Liang et al., 2014b). Pour étudier ce mécanisme de dégradation protéosomale, nous avons utilisé un inhibiteur du protéasome, le MG-132. Les cellules 5F31 Ctrl et 5F31 YAPdc ont été traitées pendant 96 heures ou non au 5FU, avec ou non traitement au MG-132 pendant les 48 dernières heures de traitement.

Après récupération des cellules, nous avons analysé le niveau d'expression de YAP et de la Cycline E1.

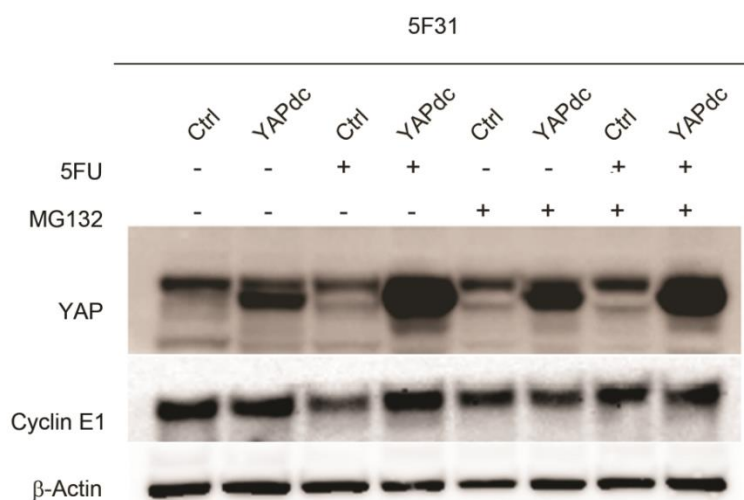


Figure n°49: Le traitement au 5FU induit la diminution d'expression de YAP via sa dégradation protéosomale. Expression protéique de YAP, Cycline E1 et β -Actine dans les cellules 5F31 Ctrl et YAPdc traitées ou non au 5FU (40 μ M pendant 96 heures) avec ou sans traitement au MG-132 (1 μ M sur les 96 heures de traitement ou non au 5FU).

L'inhibition du protéasome par traitement au MG-132 pendant le traitement au 5FU s'oppose à la diminution de YAP et de la Cycline E1 dans les cellules 5F31 Ctrl. **Ces données nous indiquent que la diminution de YAP sous 5FU dans les cellules 5F31 est dépendante de la voie du protéasome.**

III Analyse de YAP/TAZ dans des métastases humaines de cancers colorectaux

3.1 Expression de YAP/TAZ et caractéristiques clinicobiologiques associées

Afin d'étudier le rôle de YAP/TAZ dans la récurrence tumorale, nous avons analysé l'expression des transcrits de YAP, TAZ, de leurs cibles Cyr61, CTGF, AXL et du Ki67 dans la collection de métastases humaines issues de la Tumorothèque du CHRU de Lille. Nous avons fixé un seuil de surexpression de 2 par rapport au tissu contrôle (foie péri-tumoral) ; avec ce *cutoff* ainsi déterminé, 42 patients sur 70 ont un niveau d'expression de YAP et de TAZ inférieur à deux. A l'inverse, 28 patients ont un niveau de surexpression de YAP, de TAZ ou des deux co-activateurs supérieur à deux. Après ségrégation des patients en fonction du niveau d'expression de YAP et TAZ, nous avons comparé les données clinico-biologiques des deux sous-populations. Ces données, ainsi que les *p-value* correspondantes, sont indiquées ci-dessous.

Tableau n°3 Caractéristiques clinico-biologiques de la cohorte de patients en fonction du niveau d'expression de YAP/TAZ			
	YAP/TAZ faible	YAP/TAZ élevé	p
Nombre de patients	42	28	
Age			0,075
< 60 ans	21 (50%)	8 (28,6%)	
> 60 ans	21 (50%)	20 (71,4%)	
Site de la tumeur primaire			0,249
Côlon droit	8 (19%)	8 (28,6%)	
Côlon gauche	23 (54,8%)	17 (60,7%)	
Rectum	11 (26,2%)	3 (10,7%)	
Métastases synchrones			0,150
Oui	13 (31%)	13 (48,1%)	
Non	29 (69%)	15 (51,9%)	
Métastases bilobaires			0,810
Oui	2 (4,8%)	1 (3,6%)	
Non	40 (95,2%)	27 (96,4%)	
Statut T			0,475
Tis. T1. T2	7 (21,2%)	3 (13,6%)	
T3. T4	26 (78,8%)	19 (86,4%)	
Tx	9 (11,9%)	6 (3,5%)	
Statut N			0,678
N0	19 (45,2%)	10 (35,7%)	
N+	14 (33,3%)	12 (42,9%)	
Nx	9 (21,4%)	6 (21,4%)	
Chimiothérapie néo-adjuvante	17 (40,5%)	17 (60,7%)	0,097
FOLFOX	11	9	0,589
FOLFIRI	6	8	0,143
XELODA	2	0	0,241
avec bevacizumab	6 (13,3%)	9 (28,6%)	0,074
sans bevacizumab	36 (85,7%)	19 (71,4%)	
* les valeurs exprimées sont les médianes et l'écart interquartile			

Seul l'âge des patients ainsi que l'administration d'une chimiothérapie néo-adjuvante associé aux biothérapies anti VEGF présentent une différence tendant vers la significativité entre les deux groupes. (Le fait qu'une majorité de patients dans le groupe YAP/TAZ élevé ait reçu une chimiothérapie néoadjuvante est cohérent avec les données préalables de notre équipe montrant une expression plus élevée de YAP dans le groupe recevant une chimiothérapie néo-adjuvante).

3.2 Expression de YAP/TAZ et association avec l'Index de prolifération

Nous avons analysé l'expression des gènes cibles de YAP/TAZ-TEAD (Cyr61, CTGF, AXL) ainsi que du Ki67 dans les groupes YAP/TAZ faible (n=42) *versus* YAP/TAZ élevé (n=28).

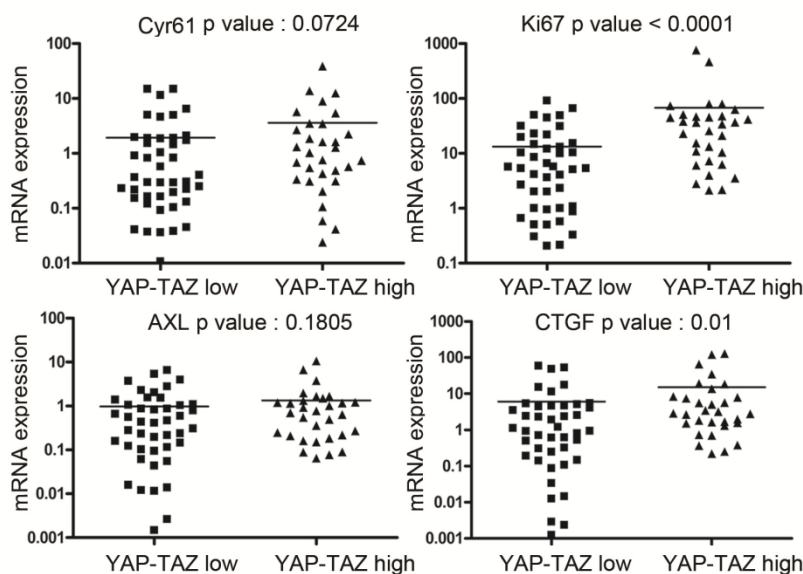


Figure n°50 : Expression des transcrits Cyr61, CTGF, AXL et Ki67 dans les groupes YAP/TAZ faible et YAP/TAZ élevé. Représentation en nuages de points des niveaux d'expression des 4 gènes dans les métastases hépatiques de patients, suivant qu'ils soient classés dans les sous-groupes YAP/TAZ faible ou élevé. Les *p-value* de chaque comparaison sont précisées au-dessus de chaque transcrit.

Comme visible ci-dessus, l'expression élevée de YAP, TAZ ou des deux est associée à une expression significativement plus importante du CTGF et du Ki67 (Cyr61 étant à la limite de significativité, p value = 0,0724). En revanche, nous n'avons pas trouvé de corrélation entre l'expression du RTK AXL et l'expression de YAP/TAZ (p value = 0,1805) dans le tissu métastatique hépatique.

Nous avons ensuite analysé l'expression protéique de YAP/TAZ et du Ki67 par Immunohistochimie. Nous avons utilisé un anticorps ciblant un épitope commun de la partie C-terminal de YAP et de TAZ. Cette étude a été réalisée sur une partie de la cohorte (n=16 patients). Sur cette partie de la cohorte, 7 patients (43,7%) expriment les deux co-activateurs (avec un marquage des cellules tumorales métastatiques compris entre 5 et 80%, déterminant le groupe *YAP/TAZ high*). 9 patients présentent soit une absence de marquage (7 patients), soit une localisation strictement cytoplasmique des deux acteurs, indiquant leur inactivation (groupe *YAP/TAZ low*). Un cliché représentatif de chaque groupe est représenté sur la **Figure n°51**. Nous avons réalisé un marquage du Ki67 sur les mêmes patients et étudié le pourcentage de cellules tumorales Ki67 positives en fonction des groupes *YAP/TAZ low* ou *high*.

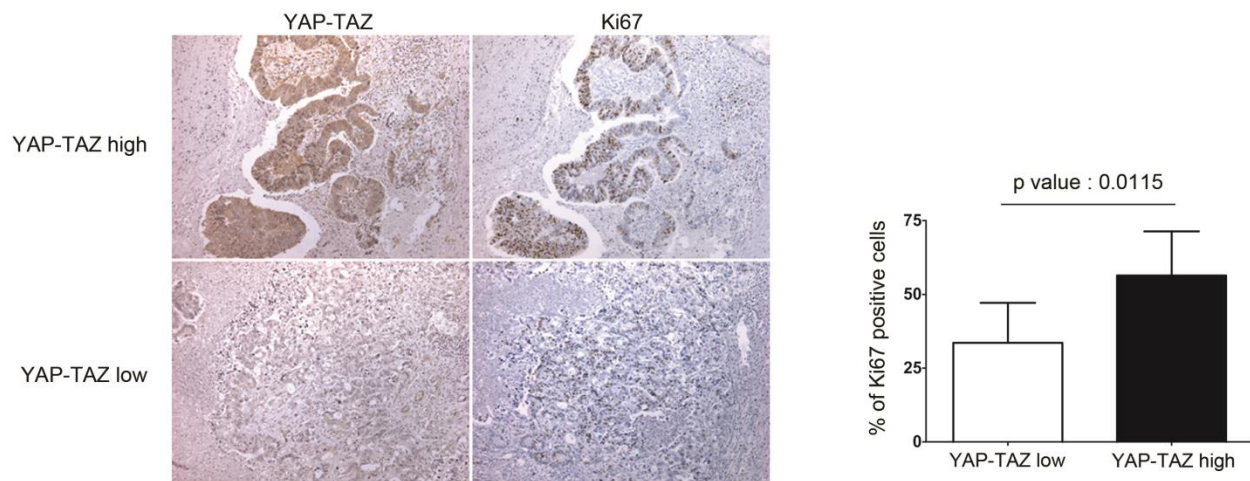


Figure n°51 : Association entre expression protéique de YAP/TAZ et index de prolifération. Immunohistochimie de YAP/TAZ et Ki67 sur métastases de patients incluses en paraffine. Grossissement x 100. Comparaison des Index de prolifération des métastases des groupes YAP/TAZ faibles et YAP/TAZ élevés. La *p-value* est précisée au-dessus des groupes.

Les clichés de la **Figure n°51** sont représentatifs des deux groupes décrits précédemment ; comme visible, l'expression élevée de YAP/TAZ et leur localisation préférentiellement nucléaire est associée à un Index de Prolifération plus important, avec plus de 50% de cellules tumorales immunoréactives pour le marquage Ki67 (*p-value* : 0,0115).

Ainsi, l'expression élevée des transcrits ou protéines de YAP/TAZ est associée à un Index de prolifération significativement plus important, reflet du rôle de ces protéines dans la prolifération cellulaire.

3.3 Expression de YAP/TAZ et association avec les données de survie globale et sans récurrence des patients

Nous avons analysé l'impact de l'expression élevée de YAP/TAZ sur les données de survie globale et de récurrence de la maladie dans la cohorte de 70 patients dont le suivi est colligé par le service du Professeur Pruvot.

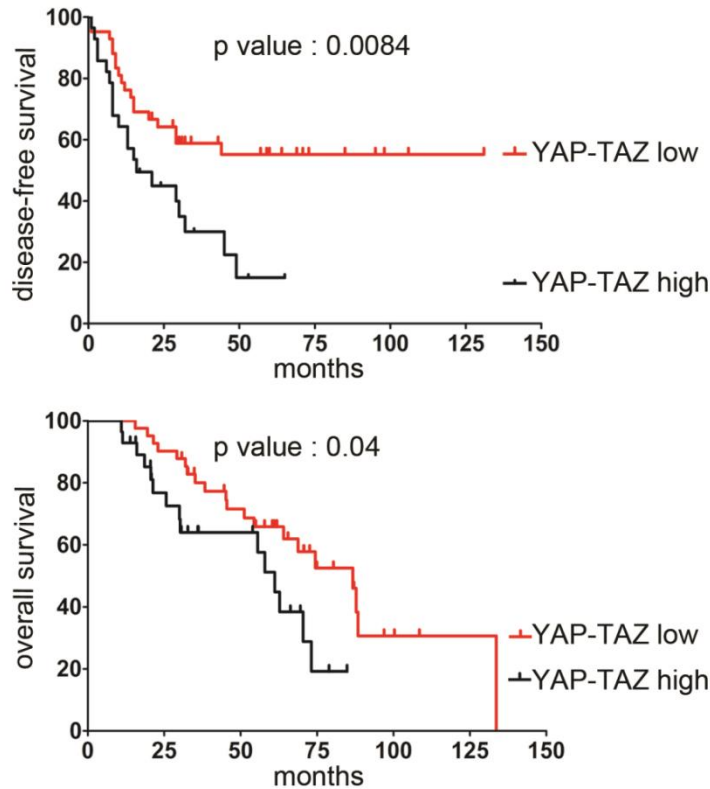


Figure n°52 : Importance de l'expression de YAP/TAZ sur le pronostic des patients atteints de CRC métastatiques. Courbes de survie globale et survie sans récurrence en Kaplan-Meier. Les *p-value* sont indiquées sur chaque graphique.

Comme visible sur la **Figure n°52**, les patients ayant une expression élevée de YAP/TAZ dans le tissu métastatique ont une survie globale (*p-value* : 0,04) et sans récurrence (*p-value* : 0,0084) plus faible comparativement aux patients du groupe *YAP/TAZ low*.

Analyses uni et multivariée sur la survie sans récurrence

Nous avons analysé la pertinence de l'expression de YAP/TAZ au regard des autres paramètres clinico-biologiques à notre disposition concernant la récurrence métastatique.

Tableau n°4 Analyse univariée de la survie sans récurrence des patients			
	Nombre de patients	SSR (mois)*	Log-rank p value
YAP/TAZ			
élevé	28 (40%)	15 [8-31]	0,008
faible	42 (60%)	30,5 [14-60]	
Age			
< 60 ans	29 (41,4%)	28 [9-45]	0,832
> 60 ans	41 (58,6%)	23 [13-49]	
Site de la tumeur primaire			
Côlon droit	16 (22,9%)	29 [14,5-53]	0,168
Côlon gauche	40 (57,1%)	16,5 [8-35]	
Rectum	14 (20%)	37,5 [20-60]	
Métastases synchrones			
Oui	26 (37,1%)	15 [8-45]	0,024
Non	44 (62,9%)	29 [15-60]	
Métastases bilobaires			
Oui	3 (4,3%)	23 [9-45]	0,762
Non	67 (95,7%)	24 [10-53]	
Statut T			
Tis. T1. T2	10 (18,1%)	19 [14-49]	0,901
T3. T4	45 (81,9%)	24 [9-45]	
Statut N			
N0	29 (52,7%)	32 [15-59]	0,098
N+	26 (47,3%)	15 [8-31]	
Chimiothérapie néo-adjuvante			
Oui	34 (48,6%)	15 [8-35]	0,040
Non	36 (51,4%)	30 [15-60]	
* les valeurs exprimées sont les médianes et l'écart interquartile			

En analyse univariée, l'expression élevée de YAP/TAZ est un facteur sortant comme significatif sur la récurrence métastatique des patients (survie sans récurrence médiane de 15 mois pour le groupe YAP/TAZ élevé versus 30,5 mois pour le groupe YAP/TAZ faible). Les autres paramètres clinicobiologiques montrant un intérêt pronostic sur la récurrence tumorale sont le caractère synchrone de la maladie métastatique (médiane de récurrence à 15 mois versus 29 mois pour les métastases métachrones) et l'adjonction de chimiothérapie en néo-adjuvant (médiane de récurrence à 15 mois versus 30 mois pour les patients naïfs de traitement par chimiothérapie). Pour analyser l'indépendance des paramètres, nous avons réalisé une analyse multivariée, utilisant comme paramètres d'introduction les variables ayant une *p-value* inférieure à 0,05 en analyse univariée.

Tableau n°5 Analyse multivariée sur la survie sans récurrence			
	p value	Hazard ratio	Intervalle de confiance à 95%
YAP/TAZ	0,045	1,979	1,014 - 3,860
Métastases synchrones	0,115	1,690	0,880 - 3,248
Chimiothérapie Néoadjuvante	0,184	1,570	0,807 - 3,054
Variables introduites quand p value, < 0.05			

En analyse multivariée, seule l'expression élevée de YAP/TAZ sort comme étant un paramètre pronostique sur la survie sans récurrence des patients (*p-value* : 0,045), avec un **risque relatif de récurrence deux fois supérieur pour les patients exprimant fortement YAP/TAZ dans le tissu métastatique** (*Hazard ratio* [IC_{95%}] : 1,979 (1,014-3,3860)).

Analyses univariée et modèle de Cox sur la survie globale

Comme pour la récurrence métastatique, nous avons voulu étudier l'importance de l'expression de YAP et TAZ sur la survie globale des patients, en comparaison des paramètres clinico-biologiques.

Tableau n°6 Analyse univariée de la survie globale des patients			
	Nombre de patients	Survie (mois)*	Log-rank p value
YAP/TAZ			
élevé	28 (40%)	31 [21-61]	0,040
faible	42 (60%)	58 [32-73]	
Age			
< 60 ans	29 (41,4%)	54 [32-69]	0,580
> 60 ans	41 (58,6%)	44 [29-67]	
Site de la tumeur primaire			
Côlon droit	16 (22,9%)	44 [22-67]	0,409
Côlon gauche	40 (57,1%)	36 [27-65]	
Rectum	14 (20%)	62 [44-77]	
Métastases synchrones			
Oui	26 (37,1%)	54 [22-61]	0,419
Non	44 (62,9%)	50 [31-69]	
Métastases bilobaires			
Oui	3 (4,3%)	77 [12-79]	0,514
Non	67 (95,7%)	50 [29-68]	
Statut T			
Tis. T1. T2	10 (18,1%)	57 [22-73]	0,571
T3. T4	45 (81,9%)	35 [29-67]	
Statut N			
N0	29 (52,7%)	54 [43-69]	0,109
N+	26 (47,3%)	57 [30-73]	
Chimiothérapie néo-adjuvante			
Oui	34 (48,6%)	35 [21-69]	0,386
Non	36 (51,4%)	53 [31-69]	
* les valeurs exprimées sont les médianes et l'écart interquartile			

En analyse univariée, seule l'expression élevée de YAP/TAZ est un facteur sortant comme significatif sur la survie globale des patients (survie globale médiane de 31 mois pour le groupe YAP/TAZ élevé *versus* 58 mois pour le groupe YAP/TAZ faible).

Tableau n°7 Modèle de régression de Cox sur le survie globale

	p value	Hazard ratio	Intervalle de confiance à 95%
YAP/TAZ	0,045	2,058	1,018 - 4,161
Variables introduites quand p value, < 0,05			

Par le modèle de régression de Cox, l'expression élevée de YAP/TAZ est un facteur pronostique de survie des patients, **avec un risque relatif de décès deux fois supérieur** en comparaison des patients du groupe YAP/TAZ faible (*Hazard ratio* [IC_{95%}] : 2,058 (1,018-4,161)).

Nos données obtenues sur la cohorte de patients prouvent l'intérêt de l'étude des transcrits YAP/TAZ en tant que marqueurs pronostiques sur la survie globale et sans récurrence des patients. En effet, l'étude de ces marqueurs est plus prédictive que les autres critères clinico-biologiques à notre disposition dans cette étude.

3.4 Synergie entre YAP/TAZ et CREB sur la survie des patients atteints de CCR

Nous avons tenté d'établir un lien entre l'expression de YAP/TAZ et celle du facteur de transcription CREB par l'utilisation des bases de données publiques accessibles dans la littérature. Pour cela, nous avons utilisé l'outil en ligne *SynTarget* permettant, par l'analyse de données transcriptomiques disponibles en ligne, de déterminer si l'expression de deux gènes en simultané a une valeur pronostique sur la survie globale. Pour le cancer colorectal, nous avons utilisé la base *GEO GSE39582* (de laquelle découlent les travaux de la publication (Marisa et al., 2013) contenant les données transcriptomiques de 566 cancers primitifs, du stade I au stade IV). Nous avons donc testé deux à deux les effets de l'expression élevée de : YAP/CREB , TAZ/CREB et YAP/TAZ sur la survie globale de patients atteints de cancers colorectaux.

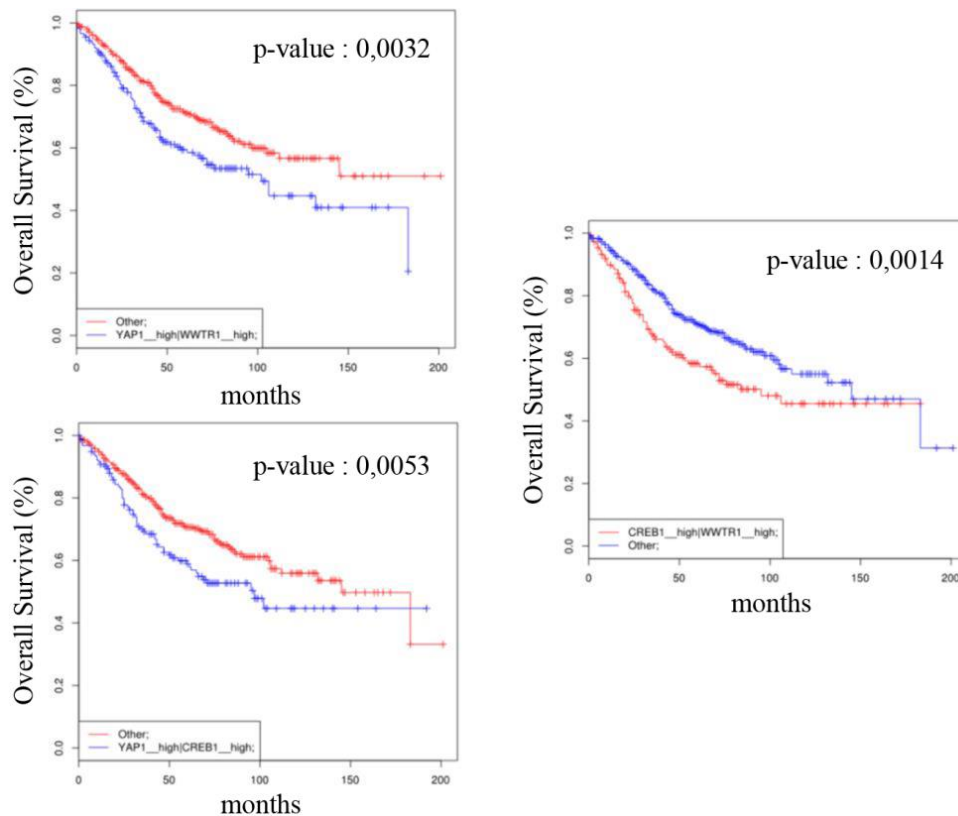


Figure n°53 : Courbes de survie globale de patients issus de la base GSE39582 en fonction de l'expression élevée des transcrits de : YAP/TAZ, YAP/CREB ou TAZ/CREB. Les valeurs des *p-value* mesurées par analyse univariée sont représentées sur les graphiques. Les groupes « autres » correspondent aux patients exprimant faiblement l'un ou l'autre des deux transcrits.

Les résultats montrent un effet synergique de l'expression élevée commune de YAP et CREB (n = 181 patients avec une forte expression des deux transcrits, soit 32,2 %, p-value = 0,00532) et de TAZ et CREB (n = 151, soit 26,7 % des patients avec une expression élevée des deux transcrits, p value = 0,00141) sur la survie globale des patients. Nous avons aussi retrouvé un effet synergique de l'expression élevée de YAP et TAZ (n = 176 sur 562 patients, soit 31,3 % de l'effectif) pour les CCR primaires (p value : 0,0032), renforçant nos données obtenues sur le tissu métastatique hépatique.

Sur une cohorte indépendante de la nôtre, nous observons que l'expression élevée conjointe de CREB avec soit YAP soit TAZ est associée avec un pronostic de survie plus sombre pour le patient ; l'expression conjointe de YAP/CREB ou TAZ/CREB n'est pas négligeable puisqu'elle s'observe dans près d'un patient sur trois. Ces données nous encouragent à poursuivre la recherche des liens unissant YAP/TAZ à CREB dans les CCR.

Conclusion des parties II et III

Les données obtenues depuis la publication dans *Clinical Cancer Research* se sont focalisées sur l'étude des protéines YAP/TAZ dans la régulation entre la prolifération et la quiescence cellulaire. Celles-ci montrent que :

- L'invalidation par siARN de la protéine YAP et/ou de son paralogue TAZ ou son inhibition pharmacologique par la Verteporfine conduit à l'augmentation du pourcentage de cellules quiescentes dans les lignées cellulaires RKO, HCT116 et le clone chimiorésistant 5F31.
- L'induction de quiescence par le 5FU dans le clone chimiorésistant 5F31 ou par inhibition/invalidation de YAP/TAZ est associée à une signature moléculaire particulière avec diminution de l'expression protéique de la Cycline E1 et du facteur de transcription c-Myc. L'invalidation par siARN de la cycline E1 dans nos trois modèles cellulaires reproduit la diminution de prolifération et l'augmentation de la fraction de cellules quiescentes, proposant la Cycline E1 comme l'un des effecteurs de YAP/TAZ dans la régulation entre la croissance/dormance tumorale.
- La diminution d'expression de YAP sous 5FU dans le clone chimiorésistant 5F31 est due à sa dégradation, au moins en partie, par le protéasome (pas de diminution de l'expression des transcrits de YAP sous chimiothérapie). L'inhibition pharmacologique du protéasome s'accompagne d'une réexpression de YAP et de la Cycline E1 sous 5FU.
- La surexpression de la forme constitutivement active de YAP avec substitution du résidu Sérine 127 par une Alanine inhibe l'induction de quiescence sous chimiothérapie et maintient le niveau d'expression de la Cycline E1 dans le clone 5F31. Ce maintien des cellules en phase de prolifération est associé à une survie plus faible après sevrage de la chimiothérapie, faisant le lien entre quiescence cellulaire et résistance aux antiprolifératifs. La surexpression du YAP^{S127A} s'accompagne d'une augmentation du niveau basal d'activation du facteur de transcription CREB, activation potentialisée par le traitement au 5FU. L'utilisation d'un inhibiteur des

complexes entre P-CREB et CBP, permet d'empêcher le blocage de la quiescence et de diminuer le niveau d'expression de la Cycline E1, proposant CREB comme étant un médiateur dans le blocage de la quiescence YAP-dépendant.

- L'étude de l'expression des co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ dans une cohorte de 70 métastases hépatiques de patients atteints de cancer colorectaux montre une association forte entre ces marqueurs et un Index de Prolifération élevé dans le tissu tumoral. De plus, l'expression élevée des co-activateurs transcriptionnels est synonyme de rechute plus précoce et de survie globale plus faible pour le patient, renforçant l'intérêt de l'étude et de la recherche d'inhibiteurs de ces protéines.

Discussion

Quiescence cellulaire et récurrence métastatique

La question de la récurrence tumorale est d'actualité dans le domaine de la cancérologie ; en effet, des études depuis une dizaine d'années dans des cancers d'origines épithéliales (Janni et al., 2011) ou les hémopathies malignes (Chu et al., 2011) sont conduites pour expliquer les mécanismes de récurrence tumorale chez des patients cliniquement asymptomatiques après traitement chirurgical ou par radio-chimiothérapie. La persistance tumorale dans les sites métastatiques se retrouve sous la forme de cellules tumorales disséminées, principalement quiescentes dans les sites secondaires. L'on peut citer le cancer du sein, où la présence de cellules cancéreuses épithéliales quiescentes disséminées dans la moelle osseuse des patientes (retrouvée chez une patiente sur 5 après thérapie) est associée à une récurrence plus précoce et une survie globale plus faible (Janni et al., 2011). Dans le cadre du CCR, la dissémination métastatique a lieu essentiellement au niveau du foie et la majorité des patients aura récidivé avant deux ans, quelque soit la prise en charge thérapeutique encadrant la résection tumorale.

La quiescence est aussi décrite comme permettant aux cellules d'échapper aux chimiothérapies anti-métaboliques (les cellules ne proliférant pas n'étant pas ciblées par ces molécules) dans de nombreux types tumoraux, épithéliaux ou hématologiques. En effet, dès 2002, les travaux de Graham et collaborateurs (Graham, 2002) ont démontré que le Glivec[®], inhibiteur de la protéine de fusion à activité tyrosine kinase BCR-ABL, est inefficace sur les progéniteurs CD34+ quiescents dans le cadre des leucémies myéloïdes chroniques, même à fortes doses (10 μ M). Le Glivec[®] est également utilisé dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales surexprimant le récepteur à activité tyrosine kinase c-Kit ; les travaux de Boichuk (Boichuk et al., 2013) ont démontré que le traitement de lignées cellulaires de GIST par le Glivec s'accompagne d'un ralentissement du cycle cellulaire et d'augmentation des cellules quiescentes. Le blocage de l'induction de la quiescence conduit à une augmentation de la mort cellulaire après traitement par le Glivec[®]. Dans le cancer du pancréas (Cioffi et al., 2015), la surexpression du mir 17-92 force les cellules à rester dans le cycle cellulaire, diminue la fraction de cellules quiescentes et augmente la sensibilité des cellules à la Gemcitabine, modèle somme-toute assez proche du nôtre. La compréhension des

mécanismes sous-tendant l'entrée en quiescence et la réactivation des cellules en prolifération a été le moteur de ce travail. Nos données obtenues ont montré l'importance de la s-Src kinase c-Yes et des co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ dans ces mécanismes. C-Yes est connu en tant que Src kinase pour activer la croissance cellulaire, après activation par les RTK ou les RCPG. YAP et TAZ sont aussi décrits pour jouer un rôle acteur dans la prolifération tumorale, cependant les effecteurs protéiques dépendants de ces co-activateurs transcriptionnels sont encore non clairement identifiés. Nos résultats ont montré comment la régulation de l'expression et du trafic intracellulaire de ces 2 protéines pouvaient induire l'entrée en quiescence et ont identifié comme cible des effecteurs du cycle cellulaire, tels que le facteur de transcription c-Myc et la Cycline E1.

Régulation de la quiescence : rôle de la Cycline E1

Dans nos différents modèles cellulaires traités à la Verteporfine, ou quand l'expression de YAP et/ou TAZ est invalidée, l'expression du facteur de transcription c-Myc et de la Cycline E1 se trouve impactée et diminuée. Si c-Myc est une cible décrite de YAP/TAZ (Zanconato et al., 2015), la Cycline E1 a jusqu'à présent été principalement caractérisée comme une cible de Yorkie et de Scalloped dans les modèles drosophiliens (Huang et al., 2005)(Meserve and Duronio, 2015). Des éléments de la littérature ont déjà utilisé la Cycline E1 comme marqueur de la prolifération modulée par YAP/TAZ. Ainsi, l'inhibition de l'expression de NF2 par siARN dans des lignées cellulaires humaines de méningiomes aboutit à la surexpression importante de la cycline E1 (Striedinger et al., 2008). L'inactivation des kinases Mst1/Mst2 ou la localisation préférentiellement nucléaire de YAP de même que son amplification dans des tumeurs hépatiques (LaQuaglia et al., 2016) sont associés à l'expression plus importante de la cycline E1 (Zender et al., 2006). L'utilisation de shRNA ciblant YAP dans la lignée cancéreuse d'hépatocarcinome cellulaire HCC-1 est associée à la perte d'expression des protéines c-Myc et Cycline E1, ainsi qu'au ralentissement de la prolifération cellulaire. Dans nos travaux, nous montrons que l'inhibition des deux coactivateurs transcriptionnels induit la diminution de l'expression de la Cycline E1, tant au niveau du transcrit que de la protéine, dans les lignées cellulaires exprimant à la fois YAP et TAZ. Cependant, les données issues du Chip-seq récemment publié sur cellules MDA-MB231 (Zanconato et al., 2015) n'ont pas identifié la Cycline E1 parmi les cibles directes de ces co-activateurs, au contraire de c-Myc. Signalons toutefois que la Cycline E1 peut être, directement ou indirectement, contrôlée par c-Myc dans les modèles murins de

développement de cancers du sein Myc-dépendants (Geng et al., 2001). Ainsi, la Cycline E1 pourrait être une cible indirecte de YAP/TAZ ou pourrait impliquer des facteurs de transcription autres que TEAD.

La Cycline E1 est une cycline décrite comme permettant la progression des cellules vers la phase de réplication de l'ADN, au même titre que l'autre Cycline E, la cycline E2 avec laquelle elle partage près de 50% d'homologie de structure. Les cyclines E sont décrites comme interagissant avec la *Cycline Dependant Kinase* CDK2 dans les cellules en prolifération. Cependant, à côté de cette fonction canonique de la Cycline E1 dans la transition G1-S, des fonctions indépendantes des complexes Cycline/CDK ont été décrites pour les Cycline E1 et E2 dans la formation des fourches de réplication de l'ADN (Geng et al., 2007). La mise en culture de fibroblastes embryonnaires murins déficients en cycline E1 et cycline E2 ne montre pas de différence par rapport aux souris sauvage dans leur capacité à proliférer si le milieu contient du sérum. Cependant, après déprivation en sérum, les cellules rendues quiescentes invalidées pour la Cycline E1 et E2 sont incapables de retourner dans le cycle cellulaire, suggérant un rôle de la Cycline E1 dans l'entrée dans le cycle en plus de la progression dans le cycle cellulaire (Geng et al., 2003). De plus, la Cycline E1 facilite la ré-entrée rapide dans le cycle cellulaire des cellules souches hématopoïétiques quiescentes après chimiothérapie myéloablatrice par traitement au 5FU (Campaner et al., 2013).

Nos résultats confortent ce rôle de la Cycline E1 dans la transition G0/G1 puisque son invalidation dans nos lignées cellulaires HCT116 et RKO ainsi que dans le modèle clonal 5F31 conduit à l'augmentation du pourcentage de cellules quiescentes. Cette cycline particulière est donc l'un des effecteurs terminaux de YAP et TAZ dans la régulation du cycle cellulaire.

Quiescence cellulaire et voies de dégradation

L'induction de quiescence par le traitement au 5FU dans le modèle cellulaire 5F31 conduit à la diminution de l'expression de la protéine YAP, de c-Myc et de la Cycline E1. L'inhibition du protéasome est capable de restaurer l'expression à la fois de YAP et de la Cycline E1. Il est connu que la dégradation de YAP fait intervenir la E3 Ubiquitine Ligase β -Trecp, après son hyperphosphorylation par les kinases de la voie Hippo puis la Caséine kinase. La diminution de la Cycline E1 pourrait être le reflet de la diminution de YAP. Cependant, une autre hypothèse serait que la Cycline E1 puisse elle même être dégradée par voie

protéosomale sous 5FU. Il existe deux voies de dégradation protéosomale de la Cycline E1 : la voie BTB-Cullin1 impliquée dans la dégradation de la Cycline E1 non phosphorylée et la voie Fbxw7-Cullin3 impliquée dans la dégradation de la cycline E1 phosphorylée par CDK2. La E3 Ubiquitine ligase Fbxw7 est d'ailleurs impliquée dans la dégradation d'autres régulateurs clés dans la progression du cycle cellulaire, tels que c-Myc, Notch ou mTOR. Ces observations laissent entendre que la dégradation de ces régulateurs pourraient aussi jouer un rôle dans l'entrée en quiescence des cellules 5F31 traitées par chimiothérapie. La dégradation protéosomale, via Fbxw7, est décrite dans la leucémie myéloïde chronique comme permettant la persistance des blastes quiescents, population cellulaire insensible à l'Imatinib. L'invalidation de Fbxw7 force les blastes leucémiques à rester dans le cycle, les sensibilisant à la chimiothérapie (Takeishi et al., 2013). Ces résultats dans des modèles leucémiques renforcent nos données sur la diminution de YAP, de la Cycline E1, l'induction de quiescence et une réponse moindre à la chimiothérapie. De plus, la protéine Fbxw7, a été décrite dans le carcinome hépatocellulaire comme inhibant l'expression de YAP. En effet, la surexpression de Fbxw7 est associée à la perte d'expression de YAP, mais aussi de c-Myc et de la Cycline E, confortant le rôle de YAP sur la régulation de ces protéines (Tu et al., 2014). La surexpression de la forme active de YAP dans nos cellules 5F31 insensible à la dégradation protéosomale, force les cellules 5F31 à rester en prolifération et diminue le potentiel clonogénique de nos cellules.

Nous pouvons ici émettre l'hypothèse que le maintien d'une forme constitutivement active de YAP dans le noyau des cellules sous traitement par la chimiothérapie conduit à l'induction de gènes pro-apoptotiques. En effet, YAP a été décrit comme interagissant par ses domaines WW (avec une interaction préférentielle pour les isoformes possédant deux domaines WW) avec le facteur de transcription p73 après un stress génotoxique tel que le traitement au cisplatine ou après irradiation.

YAP/TAZ et reprise de prolifération cellulaire

Notre étude sur les prélèvements de MHCCR montre l'intérêt de l'étude des protéines YAP et TAZ dans le cadre des cancers colorectaux métastatiques. L'analyse des paramètres clinico-biologiques associés aux groupes exprimant faiblement ou fortement les transcrits de YAP et TAZ ne montre pas de différence significative sur les caractéristiques de localisation de la tumeur primitive, de l'adjonction de chimiothérapie en néoadjuvant ou autres paramètres

cliniques analysés. L'absence de différence quant à la localisation anatomique de la tumeur (différence traditionnelle entre les CCR droits et gauches, associés aux cancers du rectum) montre que l'état d'activation de la voie de signalisation Hippo ne serait pas cantonné à une voie de cancérogénèse colique donnée. Il serait intéressant de compléter ces études par l'analyse des voies moléculaires et des gènes mutés dans les tumeurs de ces patients, mais, au vu de l'analyse des données transcriptomiques récentes réalisées sur le CCR, il ne devrait pas avoir de profil génique ou moléculaire particulier en fonction du niveau d'expression de YAP/TAZ.

Concernant l'expression des gènes cibles, nous observons que l'expression élevée au niveau transcriptionnel de YAP et/ou de TAZ est associée à l'expression plus importante des transcrits CTGF et Ki67 (en étant proche de la significativité pour l'autre protéine de la famille CCN Cyr61). Cependant, nous n'avons pu observer de corrélation entre l'expression élevée de YAP/TAZ et AXL dans les métastases de cancers colorectaux. Une étude précédente a observé dans des tumeurs primitives du CCR une association entre l'expression de TAZ, Cyr61 et AXL ; nous pouvons imaginer toutefois que l'expression élevée d'AXL dans la tumeur primitive est le corollaire d'une agressivité et d'une dissémination accrue et que l'expression de ce RTK est diminuée après implantation des cellules tumorales dans les foyers métastatiques. Comme précisé ci-dessus, l'expression des transcrits du Ki67 est la plus importante dans le groupe YAP/TAZ élevé, confortant nos données sur l'importance des co-activateurs dans la reprise de prolifération cellulaire des cellules tumorales disséminées dans le foie.

Indépendamment des statuts mutationnels/épigénétiques, les données des puces des études transcriptomiques décrites dans la partie introductive sur le CCR montrent que dans le panel des transcrits permettant de distinguer les groupes : mésenchymateux/cellules souches nous retrouvons dans 3 études sur 6 les effecteurs de la voie Hippo ou certains de leurs gènes cibles : AXL (groupe EMT (Roepman et al., 2014)), WWTR1 (groupe C4 cellules souches cancéreuses (Marisa et al., 2013)), WWTR1, Cyr61 et CTGF (groupe cellules souches (Sadanandam et al., 2013)). Ces données issues de cohortes de tumeurs primitives sont cohérentes avec celles que nous obtenons sur une cohorte de métastases.

Les études concernant les survies globales et sans récurrences de notre cohorte de patients montre l'importance de l'analyse des co-activateurs transcriptionnels YAP/TAZ sur le pronostic du patient. En effet, en analyses multivariées, seule l'expression élevée de

YAP/TAZ est associée à une récurrence métastatique plus précoce et à une survie globale plus faible (le Hazard ratio étant proche de deux pour ces deux paramètres). Bien que TEAD soit considéré comme le facteur de transcription majoritairement associé à YAP et impliqué dans la prolifération cellulaire, nos résultats ont soulevé l'importance du facteur de transcription CREB dans les effets cellulaires YAP dépendants. Grâce à l'utilisation du logiciel *Syntarget*, nous avons pu observer que l'expression conjointe des transcrits de YAP/CREB et TAZ/CREB est associée à une survie globale plus faible pour les patients atteints de cancers colorectaux aux stades non métastatiques.

Relation entre YAP/TAZ et CREB

Dans notre modèle clonal 5F31 YAPdc, nous observons une augmentation significative du niveau de phosphorylation du facteur de transcription CREB sur son résidu Ser133. Cette activation de CREB est potentialisée après ajout du 5FU. L'utilisation de l'inhibiteur de l'interaction entre phospho-CREB et CBP, le KG-501, a permis de contrer le blocage de l'entrée en quiescence sous chimiothérapie médié par le YAPdc; ces données indiquent que la voie CREB est fortement intriquée avec la voie Hippo et ses effecteurs. De plus, l'inhibition de CREB induit la diminution de l'expression des protéines Cycline E1, AXL et Cyr61. Par analyse de *Chip on chip* (Impey et al., 2004), le traitement des cellules HEK293 à la forskoline induit le recrutement de CREB sur le promoteur de la Cycline E1. De plus, un article de 2003 étudiant le promoteur du Cyr61 démontre que le traitement de cellules musculaires lisses à la sphingosine-1 phosphate induit la transcription de Cyr61 par le biais du recrutement de CREB (Han et al., 2003). Or, la S1P est décrite comme activant YAP *via* les RCPG, renforçant l'idée d'un lien entre ces deux régulateurs transcriptionnels.

Le facteur de transcription CREB est décrit comme étant plus exprimé et plus actif dans les lignées cancéreuses coliques que dans la lignée normale colique (Steven et al., 2015) ceci étant dû à l'oncogène *KRAS* muté. L'augmentation de l'activité de CREB est alors associée à une motilité et un phénotype invasif qui ne sont contrebalancés qu'après transfection de shCREB ou traitement au KG-501. De même, dans des modèles de cancers rénaux, l'utilisation d'un dominant négatif de CREB, la construction CREB^{S133T}, conduit à un ralentissement significatif de la prolifération de la lignée OS-RC2, associé à la diminution du niveau de phosphorylation du CREB endogène (Wang et al., 2015b). CREB est impliqué dans la transition G0/G1-S puisque son invalidation transitoire dans les lignées T98G et U118 de

glioblastomes induit leur arrêt en phase G0/G1, associé à la diminution des cellules en phase S et G2/M (Daniel et al., 2014). Il est intéressant de noter que les lignées cellulaires de cancers colorectaux possédant une activation TEAD soutenue présentent un niveau basal de CREB actif plus important (notamment le cas pour les HCT116 et RKO, données non représentées).

Dans la littérature, CREB n'est que rarement décrit comme associé à la voie Hippo. Dans des lignées cancéreuses d'hépatocarcinomes, l'activation de CREB induit la transcription de YAP par fixation direct sur son promoteur proximal, alors que YAP est capable de stabiliser CREB en retour par inhibition de sa dégradation protéosomale, définissant une boucle d'amplification entre les deux acteurs (Wang et al., 2013a). Dans des modèles de souris diabétiques, l'activation soutenue de la voie EGFR-Akt-CREB dans un contexte hyperglycémique induit également une augmentation de l'expression de YAP (Chen and Harris, 2015).

Dans nos modèles cellulaires la transfection du dominant constitutivement actif de YAP s'accompagne d'une augmentation du niveau d'activation de CREB, suggérant la sécrétion de facteurs de croissance ou de médiateurs capables d'induire l'activation de voies de signalisations capables elles de phosphoryler des sérines (les plus connues ayant un rôle décrit dans l'activation de CREB étant les voies MAPK, PKA, PI3K/Akt, *etc*). Des résultats préliminaires, obtenus par la transfection du YAP^{dc} dans les cellules HCT116 tendent à conforter l'hypothèse d'une activation de CREB par YAP^{dc}, par un mécanisme qui reste à étudier. Disséquer, à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques et de siARN, les voies de signalisation nécessaires à cette activation YAP-dépendante de CREB nous permettrait de mieux comprendre le lien entre ces deux acteurs.

Une autre hypothèse pouvant expliquer l'activation de CREB induite par le YAP^{dc} est liée à la voie Cox2/PGE₂. En effet, la Cycloxygénase-2 conduit à la production des prostaglandines dont la prostaglandine E2, activateur connu de la voie de l'AMPc et de CREB, y compris dans des lignées de cancers colorectaux (Castellone and Teramoto, 2005). Dans des modèles murins APC^{min/+}, l'injection de PGE₂ induit l'augmentation du nombre de cellules souches cancéreuses Lgr5⁺ et CD133⁺ (Wang et al., 2015a). Or, l'analyse des données de transcriptome obtenues dans les modèles 5F7 et 5F31 montre que la surexpression de la forme constitutivement active de YAP s'accompagne d'une augmentation de gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire dont Cox2 (protéine codée par le gène *PTGS2*),

notamment dans le modèle 5F7 avec une surexpression de près de 8 fois. Ainsi, la régulation de la Cox2 par le dominant constitutif de YAP serait un modèle à envisager pour comprendre comment YAP et/ou TAZ régule l'activation du facteur de transcription CREB.

Signalons aussi que des résultats préliminaires nous indiquent que le YAPdc stimule l'expression du marqueur de CS ALDH1A3. A l'inverse, l'inactivation de YAP inhibe l'expression de l'ALDH1A3 de 50%, validant l'hypothèse de la régulation de l'expression de cette enzyme par YAP. Les aldéhydes déshydrogénases sont une classe d'enzymes impliquées dans le catabolisme de l'Acétaldéhyde et du Retinaldéhyde en Acétate et en ATRA (acide-tout trans rétinoïque, c'est le cas de l'ALDH1A3 (Singh et al., 2015)). Dans la littérature, l'activité Aldéhyde déshydrogénase est portée principalement par l'ALDH1A3 dont l'expression est associée au compartiment des cellules souches cancéreuses, dans le cancer du sein (Marcato et al., 2011), le glioblastome (Cheng et al., 2016) ou encore le cholangiocarcinome (Chen et al., 2016). Dans ces différents modèles, l'expression élevée de l'ALDH1A3 est corrélée à l'invasion métastatique et à une survie globale plus faible pour les patients. Ainsi, la poursuite du rôle fonctionnel de l'ALDH1A3 sur les propriétés de CSC représente une perspective intéressante dans l'identification des mécanismes YAP/TAZ dépendants.

Ces approches s'inscrivent dans la mouvance actuelle de la littérature établissant YAP et TAZ (Cox et al., 2016) comme des acteurs majeurs de la régulation du métabolisme, propriétés pouvant interférer et contribuer avec leurs rôles dans le contrôle de la balance quiescence/prolifération cellulaire.

Appendice technique

A. Cohorte de patients

Les études sur des échantillons de tissus de patients (analyses d'expression génique et protéique) sont réalisées à partir d'une cohorte dont nous avons pu disposer grâce au travail collaboratif avec le service de chirurgie digestive et de transplantation du Professeur Pruvot du CHRU de Lille. Cette cohorte comprend des fragments de métastases hépatiques réséquées chez des patients atteints de cancers colorectaux, patients dont le consentement éclairé a été recueilli et ce en accord avec les règles de bioéthique (projet avalisé par le Comité Scientifique de la Tumorotheque du CHRU de Lille). Cette cohorte comprend 70 fragments de métastases hépatiques dont 30 d'entre elles appariées avec du tissu hépatique sain adjacent. Sur ces 70 patients, 36 n'ont pas reçus de traitement de chimiothérapie avant résection des métastases et 34 ont reçus un traitement de chimiothérapie dans les 6 mois avant la résection (les régimes de chimiothérapie sont précisés dans le **Tableau n°3** de la partie III des Résultats).

La cohorte a été colligée entre 2003 et 2008 ce qui nous permet d'avoir le recul nécessaire pour le suivi des patients, ce dernier a été réalisé au moins jusqu'à 5 ans post-hépatectomie avec recueil des données relatives à la récurrence de la pathologie, du décès du patient si survenu avant 5 ans et des causes du décès (lié ou non à la résurgence de la pathologie). Après analyse des causes du décès, 5 patients initialement présents (effectif de 75 patients) ont été censurés de l'étude pour cause de décès rapide post-opération et non du fait de l'agressivité de la pathologie, ces décès précoces pouvant fausser nos analyses de survie sans récurrence et de survie globale. Les données cliniques ont été traitées et analysées par le Docteur Corfiotti, chef de clinique dans le service du Professeur Pruvot avec l'aide du logiciel SPSS® v23 (IBM Corporation). Le détail des protocoles statistiques employés pour les analyses de survie en analyse uni ou multivariées est expliqué dans la partie statistique de l'appendice technique.

B. Biologie cellulaire

Lignées cellulaires et conditions de culture

Les lignées cellulaires humaines sont maintenues dans un incubateur thermostaté à 37 °C, en présence constante de 5 % de CO₂. Sauf si précisé, elles sont cultivées dans un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose (Gibco) complété par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) préalablement décomplémenté au bain-marie à 56 °C pendant 30 minutes, 1 % de Glutamine (Gibco) et 0,5 % de Penicilline/Streptomycine (Gibco). A confluence, les cellules sont rincées avec une solution de D-PBS 1X puis décollées par l'action d'une solution de Trypsine-EDTA 0,05 % (Gibco) pendant 5 à 10 minutes en fonction de la lignée cellulaire. Du milieu complet DMEM avec SVF est ajouté pour neutraliser la trypsine lorsque le tapis cellulaire est complètement décollé. Après centrifugation (200 g, 5 min), le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans du milieu complet. Un comptage cellulaire sur lame de Malassez est effectué, après ajout de bleu de Trypan (0,05 % v/v) permettant l'exclusion des cellules mortes. A partir de cette numération, une quantité fixe de cellules variant selon la lignée cellulaire est prélevée et est déposée sur un nouveau support de culture (flasques de culture de 25 cm² (t25) ou de 75 cm² (t75) de surface). Afin d'éviter les phénomènes de dérive, les lignées cellulaires sont maintenues en culture durant un maximum de 12 passages successifs. Les principales lignées cellulaires humaines utilisées sont les lignées HT29, HCT116 et RKO, ainsi que leurs sous-populations chimiorésistantes spécifiques détaillées ci-dessous. Les phénotypes et mutations principales de ces lignées sont issues des données de la référence (Ahmed et al., 2013). Ces lignées ont été authentifiées par analyse des empreintes génétiques et comparaison avec les profils de référence de l'ATCC par le laboratoire d'Oncologie et de Génétique Moléculaires (Professeur Buisine, Centre de BioPathologie du CHRU de Lille).

HT29 et ses populations chimiorésistantes

La lignée cancéreuse HT29 (ATCC HTB-38) est issue de la tumeur primaire d'une patiente de 44 ans (Fogh et al., 1964). La tumeur originelle était classée C selon la classification de Duke (équivalent d'un stade III, Cf tableau n° I de l'Introduction). Cette lignée cellulaire HT-29 est une lignée microsatellaire stable, présentant la substitution V600E

de la kinase B-Raf. Les sous-populations ont été obtenues après traitement de la lignée parentale par le 5-Fluorouracile (5FU) (population HT29-FU dont les clones 5F7 et 5F31 sont issus par dilution limite) ou à l'Oxaliplatine (HT29-Oxa, 2 μ M d'Oxaliplatine dans le milieu de culture). Les clones chimiorésistants 5F7 et 5F31 issus de la lignée HT-29-FU sont cultivés en absence de 5FU, contrairement à la population polyclonale HT29-FU (1 μ M).

RKO et ses populations chimiorésistantes

La lignée cancéreuse humaine RKO (ATCC CRL-2577) est une lignée cancéreuse isolée d'une tumeur primaire colorectale. Les cellules RKO ont un aspect fibroblastique et sont microsatellites instables, mutées comme les cellules HT29 sur le gène codant la kinase B-Raf (substitution V600E).

HCT116 et ses populations chimiorésistantes

Les cellules HCT116 (ATCC CCL-247) ont été isolées à partir de fragments de la tumeur primaire d'un patient de 48 ans atteint d'un cancer colorectal métastatique gradé D en classification de Duke (stade IV de la classification TNM). Cette lignée cellulaire est microsatellite instable, avec mutation de la GTPase KRAS (substitution G13D) et un statut *BRAF* sauvage.

Transfection des lignées cellulaires

Invalidation transitoire de gènes

Pour inhiber l'expression des effecteurs protéiques étudiés au cours de cette étude, nous avons utilisé les siARNs *smartpools ON-TARGETplus*[®] (Dharmacon), mélange rassemblant 4 siARN ciblant diverses parties de l'ARNm visé. Les références des différents siARN utilisés dans ces travaux sont listés ci-dessous.

Cible	Référence
Non Targeting	D-001810-10-20
YAP	L012200-00-0005
TAZ	L-016083-00-0005
Cyclin E1	L003213-00-0005
CREB	L-003619-00-0005
AXL	L003104-00-0005
Cyr61	L004263-00-0005
CTGF	L-012633-01-0005
AMOT	L015417-01-0005

Tableau n°8 : Référence des différents *smartpools ON-TARGETplus*® utilisés durant cette étude.

Les siARNs lyophilisés sont resuspendus à la concentration de 20 μ M, dans un tampon (HEPES 30 mM à pH 7,5, KCl 300 mM, MgCl₂ 1 mM), selon les instructions du fournisseur. Pour une plus grande stabilité dans le temps, la solution stock de siARNs est conservée en fractions *aliquote* pour éviter les cycles de congélation/décongélation. La transfection des cellules est réalisée lors de leur repiquage ; les siARNs et le réactif de transfection (DharmaFect®) sont incubés dans la boîte de culture pendant 30 min ; la quantité de cellules souhaitée est ajoutée dans un volume adéquat de milieu de culture (les volumes de DharmaFect®, siARN, milieu de culture en fonction du support de culture sont précisés dans le tableau ci-contre). Afin de maximiser l'efficacité de transfection, le milieu de culture employé ne contient pas d'antibiotiques.

Support	Dharmafect®	siRNA (15 nM)	Milieu du Mix	Vol Suspension cellulaire
Plaque 6 puits (1 puits)	1,92 μ L	1,32 μ L	0,4 mL	1,6 mL
T25	3,84 μ L	2,64 μ L	0,8 mL	3,2 mL

Tableau n°9 : Volume des différents réactifs à prélever en fonction de la surface du support de culture cellulaire.

Le réactif de transfection varie selon la lignée cellulaire, le réactif DharmaFect® n° 1 est utilisé pour la lignée cellulaire HT-29 et ses sous-populations chimiorésistantes, alors que le réactif DharmaFect® n°4 l'est pour les lignées cellulaires RKO et HCT116. Les cellulesensemencées sont incubées pendant 48 heures, temps suffisant pour observer l'impact de

l'invalidation de la cible. La concentration finale en siARNs par condition est de 30 nM pour la lignée cellulaire HT29 et les clones chimiorésistants, 15 nM pour les lignées cellulaires HCT116 et RKO.

Transfection stable

Les populations cellulaires clonales 5F7 et 5F31 ont été transfectées avec le dominant constitutif de YAP (Ser127Ala, construction obtenue sur le site *Addgene* n° 27370). La sélection des populations transfectées est effectuée par traitement à la puromycine (1 µg/mL). Pour l'entretien des cellules après sélection, la dose de 0,5 µg/mL de puromycine est utilisée. La protéine YAP transfectée se différencie du YAP endogène par la présence d'un peptide *Flag* (motif peptidique de 8 acides aminés de séquence DYKDDDDK) en N-terminal, permettant de valider la production du YAP constitutivement actif, qui se traduit par un retard de migration observable en Western blot.

Conditions de culture

Les traitements (drogues de chimiothérapie, inhibiteurs pharmacologiques) ainsi que les temps de traitement et les populations cellulaires étudiées sont précisés dans le tableau ci-contre. Les doses de traitement sont dépendantes des tests MTT réalisés pour analyser la cytotoxicité. La Verteporfine et le Naphtol AS-Phosphate (KG-501, Sigma Aldrich) sont solubilisés dans le DMSO à une concentration stock de 10 mM puis répartis en fractions aliquotes.

Molécule	Solvant	Référence
Verteporfin	DMSO	Sigma Aldrich SML0534
KG-501	DMSO	Sigma Aldrich 70485
5FU	Milieu	Pharmacie centrale (CHRU)
Oxaliplatine	Milieu	Pharmacie centrale (CHRU)

Tableau n°10: Liste et références des différents inhibiteurs ou agents de chimiothérapies utilisés durant ces travaux.

Modulation des propriétés biologiques

Test de viabilité

Les différentes populations cellulaires sont ensemencées à raison de 10 000 cellules dans 100 μ L par puits d'une microplaque de 96 puits. Le lendemain, une gamme d'inhibiteur ou de chimiothérapie (concentrations des gammes précisées dans la partie Résultats) est ajoutée à raison de 200 μ L par puits. Les temps d'incubation varient suivant les molécules analysées, de 48 heures pour les inhibiteurs pharmacologiques à 96 heures pour les traitements au 5FU ou à l'Oxaliplatine (avec renouvellement du milieu à 48 heures).

A la fin du traitement, le test de viabilité au sel de tétrazolium (MTT, Sigma-Aldrich) est réalisé. Le milieu de culture de chaque puits est aspiré et 200 μ l d'une solution de MTT sont ajoutés (0,5 mg/mL dans du milieu) ; suivant le type cellulaire et son métabolisme, le temps d'incubation varie (pour les lignées cellulaires coliques, environ 30 minutes suffisent). Le MTT va être métabolisé par les succinates deshydrogénases cellulaires pour former un composé violet dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie. Pour pouvoir doser la formation des sels de tétrazolium, la solution de MTT est aspirée et les sels sont solubilisés par ajout de 100 μ L de DMSO par puits. La densité optique du composé formé est mesurée à 570 nm au lecteur de plaque (Modèle 680, Bio-Rad) puis rapportée à l'absorbance des puits contrôles (cellules traitées par le solvant de la molécule testée) correspondant à la viabilité maximale (100 %).

Test de clonogénicité

Pour attester du potentiel clonogénique des différentes populations cellulaires, les cellules sont ensemencées à faible densité en puits de plaque à 6 puits, à raison de 5000 cellules par puits maximum. Après 14 jours de croissance cellulaire, le tapis est rincé au D-PBS 1X puis les cellules sont fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4 % et colorées par ajout d'une solution de cristal violet dilué dans du D-PBS 1X (concentration de travail 0,2 %, v/v). Après rinçage délicat avec de l'eau déminéralisée puis séchage des plaques, des photographies des différents puits sont réalisées pour permettre la numération du nombre de colonies présentes par puits. Un repliquat technique de trois puits minimum est compté par condition expérimentale. L'unité de mesure du potentiel clonogénique, le *Colony Forming*

Unit est le rapport du nombre de colonies formées sur le nombre de cellules ensemencées par puits et est exprimé en pourcentage.

Culture non adhérente

Le test de formation de sphères permet, via l'utilisation d'un milieu appauvri en sérum de veau fœtal et en absence d'adhérence cellulaire, d'enrichir la population en cellules possédant des propriétés de cellules souches.

Le milieu inducteur de sphères est le DMEM L-glutamine F12 (Gibco) complété par du B27 (complément contenant des vitamines, des hormones, etc) au 1X (Gibco) ainsi que les facteurs de croissance EGF (STEM CELL technologies) et bFGF (Promokine) à la concentration finale de 20 ng/mL de milieu. Ce milieu ne contient ni SVF, ni antibiotiques.

Le support non adhérent est obtenu en traitant des plaques 24 puits au Poly(2-Hydroxyethylmetacrylate) (pHEMA, Sigma-Aldrich). Le pHEMA, sous forme lyophilisé, est dissous à une concentration de 100 mg/mL dans de l'éthanol 95 %, sous agitation magnétique. Cette solution, conservée à température ambiante, est diluée dans de l'éthanol 95 % afin d'obtenir une solution à 5 mg/mL : 200 µL de la dilution sont déposés dans chaque puits d'une plaque 24 puits qui est ensuite incubée à 37 °C, sous agitation, en atmosphère sèche, jusqu'à évaporation totale de la solution et prise du polymère. Les plaques sont ensuite scellées avec du Parafilm et conservées à 4°C, jusqu'à utilisation.

Les cellules sont ensemencées sur les plaques coatées avec le pHEMA à une densité de 5000 cellules/mL par puits dans le milieu inducteur de sphères préalablement décrit, à raison d'un mL par puits de plaque 24 puits. Suite à l'ensemencement, les plaques sont laissées dans l'incubateur pendant 1 semaine, pour permettre la croissance des sphères. Une fois formées, les sphères peuvent être comptées, récupérées pour en extraire les ARNm, les protéines ou incluses dans une matrice pour analyses immunocytochimiques.

Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux

Pour étudier le cycle cellulaire, nous utilisons l'Iodure de Propidium (IP, Sigma Aldrich, *Propidium iodide in solution*), molécule fluorescente à la longueur d'onde de 617 nm après excitation par un laser de longueur d'onde de 488 nm. L'IP s'intercalant dans l'ADN,

l'analyse en cytométrie en flux de la fluorescence émise par la molécule permet de discriminer les cellules avec un contenu en ADN dit 2n (pic G0/G1), les cellules avec un contenu d'ADN dit 4n (G2/M) et celles en phase S avec une fluorescence intermédiaire aux 2 pics. L'utilisation du marquage avec un anticorps anti-Ki67 permet de discriminer les cellules cyclantes (phase G1, S, G2/M), Ki67 positives des cellules quiescentes non prolifératives, Ki67 négatives (G0). La liste des réactifs nécessaires est précisée ci-dessous.

Réactifs	Référence
Ki67-488	BD Biosciences 558616
Isotype-488	BD Biosciences 557702
Iodure de propidium (en solution)	Sigma Aldrich P4864
Cocktail RNase A et H1	Ambion AM2286

Tableau n°11: Liste et références des différents réactifs utilisés pour l'étude du cycle cellulaire.

Les lignées cellulaires traitées avec les différents siARNs ou molécules sont trypsinisées puis comptées ; cinq tubes de cytométrie sont préparés par condition expérimentale (200 000 cellules/tube) :

- 1 tube pour mesurer l'autofluorescence des cellules et calibrer le cytomètre pour l'acquisition.
- 2 tubes pour le monomarquage isotype/Ki67.
- 2 tubes pour coupler le marquage isotype/Ki67 avec incubation en présence de l'IP pour le marquage de l'ADN.

Les cellules sont fixées dans l'éthanol à 70 % à -20 °C pendant au moins 24 h et conservées à -20 °C. Après rinçage au D-PBS 1X et centrifugation (200g, 5 min), les cellules sont reprises dans un volume de 100 µL de milieu de culture contenant l'anticorps anti Ki67 conjugué à l'Alexafluor®-488 (0,4 µg d'anticorps pour 100 µL) ou un isotype contrôle puis incubées pendant 30 minutes sur glace. Après ajout de D-PBS de rinçage, les cellules sont centrifugées (200g, 5 min) et le culot cellulaire repris dans 500 µL de milieu de culture. Pour les tubes avec double marquage (488 et IP) les cellules sont reprises dans 500 µL de solution d'iodure de propidium (50 µg/mL et de la RNase 5 µg/mL) et incubées pendant 30 minutes à

température ambiante. A la fin de l'incubation, les cellules sont mises sur glace et analysées directement dans la solution d'IP.

L'analyse en cytométrie en flux est réalisée sur l'analyseur *CyAn-ADP*TM avec le logiciel Summit version 4.3 (Beckman Coulter). L'analyse du cycle (fluorescence mesurée sur le filtre du FITC en logarithme en ordonnée, fluorescence sur le filtre de l'Iodure de Propidium en linéaire en abscisse) se fait sur les « singulets » : il faut exclure tous les événements détectés par le cytomètre ne se situant pas sur la diagonale obtenue entre les filtres *IP lin* et *IP area* (agrégats cellulaires).

Le double marquage Ki67/IP permet de discriminer les cellules ayant 2n ADN Ki67 positives (phase G1 du cycle cellulaire) des cellules quiescentes (2n ADN, Ki67 négatives).

Expression des marqueurs de surface par cytométrie de flux

Les cellules sont décollées en phase de prolifération, entre 50 et 70 % de confluence atteinte. Le marquage se fait directement dans les tubes de cytométrie à raison de 200 000 cellules dans 100 µL de milieu de culture par tube. Le phénotypage nécessite trois tubes par marquage : un tube contenant les cellules seules, permettant de calibrer l'appareil en fonction de l'autofluorescence des cellules comme pour l'analyse du cycle ; un tube avec l'anticorps d'intérêt couplé ou non directement à un fluorochrome et un tube isotypique contrôle couplé ou non au même fluorochrome. Les concentrations d'anticorps à utiliser dépendent du type cellulaire, mais la gamme de marquage est classiquement de 0.1 à 1 µg d'anticorps pour 100 µL de suspension cellulaire. Si les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des différents fluorochromes couplés aux différents anticorps ne se recouvrent pas ou peu, des doubles ou triples marquages des cellules sont réalisés.

L'analyse en cytométrie en flux est effectuée sur analyseur *CyAn-ADP*TM avec le logiciel Summit version 4.3 (Beckman Coulter). Les différents marqueurs étudiés sont précisés dans le tableau ci-dessous.

Cible-Fluorochrome	Référence	Isotype contrôle	Concentration finale
CD24-FITC	E-Biosciences 11-0247-73	E-Biosciences 11-4714-42	0,5 µg/100 µL
CD44-v450	BD Pharmingen 561292	BD Pharmingen 560374	0,25 µg/100 µL
CD133-APC	Miltenyi Biotec 130-091-826	Miltenyi Biotec 130-092-214	0,5 µg/100 µL
CD166-PE	Bd Pharmingen 560903	Bd Pharmingen 555749	0,25 µg/100 µL

Tableau n°12: Liste et références des différents réactifs utilisés pour l'étude des marqueurs de surface associés aux cellules souches.

Etude de l'invasion cellulaire

Le comportement invasif des lignées cellulaires en présence et en absence de traitement par ARN interférence ou inhibiteurs pharmacologiques est réalisé en suivant la progression des cellules tumorales dans une matrice de Matrigel® (Corning). Les cellules sontensemencées en plaque de 96 puits (EssenBio), entre 50 000 (lignée cellulaire RKO) et 100 000 cellules (lignées HT29 et clones, HCT116) par puits. Lorsque la confluence est atteinte (24 heures post ensemencement), une blessure est réalisée dans le tapis à l'aide du *Woundmaker*™ (Essenbio), permettant d'avoir une blessure reproductible et centrée dans le puits de 700-800 µm de largeur, et ce sur l'ensemble des 96 puits. Le milieu contenant le tapis cellulaire décollé de la blessure est aspiré, et une solution de Matrigel® dilué au 1/3 dans du milieu de culture est déposée dans le puits, à raison de 40 µL de solution/puits. La plaque est incubée pendant 30 minutes à 37°C afin de permettre la polymérisation du Matrigel®, puis 60 µL de milieu sont ajoutés. Pour mesurer l'invasion cellulaire, nous utilisons un appareil, l'Incucyte™. Cet appareil comprend des emplacements pour plaques de culture et une caméra calibrée en fonction de la plaque utilisée (6, 24, 96 puits). Le dispositif est réglé pour prendre des photographies au niveau de la blessure de chaque puits sélectionné toutes les 2 heures et ce sur 36 heures. La taille des blessures est alors mesurée à l'aide du logiciel intégré à l'appareil et la compilation des données permet d'établir le pourcentage d'invasion de la matrice au cours du temps.

Pour étudier l'impact d'une molécule donnée, celle-ci est ajoutée à la concentration voulue dans la solution de Matrigel® diluée et également dans le milieu à rajouter après polymérisation de la matrice. Concernant l'utilisation de siARNs, le protocole préalablement décrit est adapté au volume d'une plaque 96 puits (100 µL de solution contenant le réactif de transfection et le siARN d'intérêt avant ensemencement des cellules dans un volume de 100 µL).

Immunofluorescence

Pour analyser l'expression et la localisation cellulaire de nos protéines d'intérêt, les cellules sont ensemencées à raison de 50 000 cellules par puits d'une lame labtek *chamber slide*™ (thermoscientific) dans un volume de 400 µL de milieu de culture. Le lendemain de l'ensemencement, la chimiothérapie ou les traitements par inhibiteurs sont réalisés. Tout comme pour l'invasion, le traitement par siARN s'effectue avant l'ensemencement par ajout de 100 µL de solution contenant le réactif de transfection et le siARN sur 300 µL de suspension cellulaire.

Les cellules sont rincées au D-PBS (Ca²⁺/Mg²⁺) puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% sur glace. La solution de PFA est neutralisée par ajout de chlorure d'ammonium (NH₄Cl, 50 mM dilué dans du D-PBS (Ca²⁺/Mg²⁺)). Les membranes cellulaires sont ensuite perméabilisées avec une solution de Saponine-Triton-X100 0,1 % (p/v) diluée dans du D-PBS. Les sites aspécifiques sont saturés par une incubation avec la solution de D-PBS Saponine-Triton-X100-BSA. L'ensemble de ces étapes (fixation, neutralisation, perméabilisation et saturation) durent 20 minutes. Le marquage avec anticorps d'intérêt se fait sur la nuit à température ambiante et aux dilutions précisées ci-dessous.

Cible	Dilution	Référence	Marquage
Ki67	1/200 ^{ème}	Sc-23900 (SCBT)	Nucléaire
YAP	1/200 ^{ème}	Sc-15407 (SCBT)	Nucléaire/cytoplasmique
Cyclin E	1/200 ^{ème}	Sc-247 (SCBT)	Nucléaire

Tableau n°13: Liste et références des différents anticorps utilisés pour les analyses par Immunofluorescence.

Le lendemain les cellules sont lavées avec du D-PBS puis incubées pendant 90 minutes dans du D-PBS Saponine-Triton BSA contenant les anticorps secondaires couplées à

un fluorochrome (Alexafluor[®]- 594, Life Technologies). Le contre-marquage des noyaux est réalisé par ajout de DAPI (Vector) dans la solution de montage *Vectashield*[®] avant montage des lamelles sur lame. Les lames sont observées sur la station ZEISS du *Bio Imaging Center* hébergé au Pôle Recherche de la Faculté de Médecine de Lille et les clichés réalisés aux grossissements X40 ou X63.

C. Biologie moléculaire

Analyse de l'expression des transcrits

Analyse transcriptomique

Pour identifier les cibles dont l'expression génique est modulée par YAP, nous avons réalisé une analyse transcriptomique par hybridation comparative d'ADN complémentaires extraits des cellules 5F31 Ctrl (transfection stable du vecteur vide) et 5F31 transfectées par le dominant constitutif de YAP^{Ser127Ala} (YAPdc), ainsi que la comparaison des cellules 5F7 Ctrl et 5F7 YAPdc. Cette analyse a été réalisée sur le plateau de la plate-forme de génomique (Dr Figeac, Université de Lille2). Les puces utilisées pour l'hybridation sont des micropuces *Agilent GEP* (Agilent-014850 *Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F*). Après hybridation et analyse comparative des intensités de fluorescence, l'analyse bioinformatique permet de mettre en évidence les transcrits dont l'expression est fortement modulée (en augmentation ou en diminution dans la condition transfectée par le dominant constitutif de YAP par rapport au vecteur contrôle). Les transcrits les plus surexprimés sont validés par RT-qPCR (les 50 transcrits les plus différenciellement modulés pour les cellules 5F7 et 5F31 sont présentés en Annexe).

Extraction des ARNm

Les ARNm totaux sont extraits directement des cellules sur leur support de culture avec le kit *NucleoSpin RNA*[®] (Macherey Nagel) en respectant les consignes du fournisseur. Brièvement, le milieu de culture est aspiré puis le tapis cellulaire est rincé avec du D-PBS. Le D-PBS est aspiré et le tapis cellulaire est lysé par ajout d'un volume de 300 μ L d'une solution RA-1 complétée par du β -Mercaptoéthanol (Sigma Aldrich) au 1/100^{ème} (v/v). L'extraction des ARN totaux à partir de tissus de patients (foie sain adjacent ou fragment de métastases) est réalisée après dissection avec une lame de scalpel dans un volume de 250 μ L de solution de lyse (RA-1 + β -Mercaptoéthanol).

L'extraction des ARN à partir d'un lysat (cellulaire ou tissulaire) se fait par l'utilisation de membranes de silice, qui vont piéger par affinité les acides nucléiques. Le lysat est tout d'abord filtré par centrifugation (11 000 g, 1 min) dans une colonne permettant de retenir les débris cellulaires. Les acides nucléiques contenus dans l'éluat sont précipités par ajout d'un volume équivalent d'éthanol 70 % (v/v) avant d'être déposés sur la matrice de silice et l'ensemble est centrifugé (11 000 g, 30s). Les acides nucléiques sont fixés sur la membrane de silice. Après rinçage par la solution dite MBD et centrifugation (11 000g, 1 min) pour éliminer les sels des tampons, 95 µL d'une solution de DNase recombinante préalablement diluée au 10^{ème} dans le tampon fourni est déposée sur la membrane. Cette dernière étape réalisée à température ambiante pendant 15 minutes, permet de digérer l'ADN génomique piégé sur la matrice de silice. Après rinçage, les ARN sont élués par ajout d'une solution d'H₂O *RNAse free* par centrifugation (11 000 g, 1 min).

La concentration ainsi que la pureté des échantillons sont analysés par dosage spectrophotométrique (Nanodrop, ThermoScientific). Le ratio des absorbances à 260 nm (absorbance des acides nucléiques) sur 230 nm reflète le niveau de contamination de l'échantillon par les sels chaotropiques présents dans les tampons du kit ; le ratio des mesures des absorbances à 260nm sur 280 nm quant à lui reflète les traces de contaminations de l'échantillon par les protéines. La pureté de l'échantillon est bonne quand les ratios sont supérieurs à 2 en valeur absolue.

Rétrotranscription des ARNm

La rétrotranscription (RT) des ARNm est réalisée par la réaction enzymatique de la M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) rétrotranscriptase, ADN polymérase ARN dépendante catalysant la formation d'ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARNm. Pour une série de rétrotranscriptions issues d'une même expérience, la quantité d'ARNm doit être fixe (usuellement 1 µg d'ARNm) ; suivant le matériel, la quantité peut varier (0,5 µg pour les tissus de patients). La quantité d'ARNm à rétrotranscrire est reprise dans un volume final de 14 µL d'H₂O *RNAse free* avec un 1 µL d'amorces oligodT15 (Promega) qui va s'hybrider à la queue poly A des ARNm. Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 70 °C.

L'étape de rétrotranscription est réalisée par l'ajout d'un mélange contenant les dNTP (Eurogentec), la M-MLV rétrotranscriptase et son tampon (Promega) dans les proportions comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

Réactif	Fabriquant	Volume à prélevé (µL)
dNTP (20 mM)	Eurogentec	2,5
M-MLV RT Buffer 5x	Promega	5
M-MLV (200 U)	Promega	1
H ₂ O <i>RNAse free</i>	Macherey Nagel	16,5

Tableau n°14: Liste, références et volumes à prélever des différents réactifs utilisés pour la rétrotranscription des ARNm

Un volume de 25 µL de ce mélange réactionnel est ajouté aux 15 µL préalablement préparés (ARNm + amorces oligodT15).

Le mélange obtenu, d'un volume total de 40 µL, est incubé pendant 1 heure à 42 °C pour permettre à l'enzyme de rétrotranscrire. Après cette étape d'incubation, le tube est immédiatement transféré dans un bain marie à 94 °C pour dénaturer la rétrotranscriptase et ainsi arrêter la réaction enzymatique. Un volume de 60 µL d'H₂O *RNAse free* est ajouté pour compléter le volume à 100 µL finaux.

PCR semi-quantitative en temps réel

La PCR semi-quantitative en temps réel (RT-qPCR) permet de quantifier les variations d'expression relatives d'un ARNm spécifique après RT et ce par rapport à l'expression d'un gène de contrôle. La technique repose sur une PCR (*Polymerase Chain Reaction*) qui permet d'amplifier une séquence d'ADN après un nombre prédéterminé de cycles. Pour quantifier la production d'ADN durant les cycles de PCR, le mélange réactionnel contient un intercalant de l'ADN, l'EvaGreen[®] (Bio-rad), composé similaire au SYBR Green, devenant fluorescent quand intercalé dans l'ADN double brin. Ainsi, le thermocycleur quantifie l'émission de fluorescence de chaque puits de la plaque 96 puits à la fin de chaque cycle d'amplification du matériel génique. La quantité de fluorescence émise est donc proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans le puits.

Les amorces utilisées pour la RT-qPCR et spécifiques d'un ARNm donné sont précisées dans le tableau ci-contre ; la température d'hybridation (T_m), température théorique à laquelle 50 % des amorces sont hybridées, ainsi que la taille de l'amplicon formé sont

notées. Ces données sont importantes ; la T_m des amorces détermine la température d'hybridation à appliquer pendant la réaction de PCR, de même qu'un amplicon trop long (supérieur à 200-250 pb) nécessitera plus de temps pour être amplifié par la polymérase. Les couples d'amorces sélectionnés sont analysés *in silico* grâce aux logiciels *Primerblast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) et *PCR in silico* de l'Université de Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>). Ce dernier logiciel permet de voir le chevauchement des couples d'amorces ou non sur plusieurs exons (amorces inter-exoniques) permettant l'amplification spécifique du matériel issu de la rétrotranscription et non de l'ADN génomique.

Pour réaliser la qPCR, un mélange réactionnel est préparé (à raison de trois puits par condition expérimentale et par transcrit). Pour chaque puits, le mélange réactionnel contient les amorces du transcrit particulier à étudier ainsi que le mélange SsoFast-EvaGreen SuperMix[®] (Bio-rad) contenant la polymérase, les dNTP ainsi que l'agent intercalant fluorescent. Par puits, le mélange suit cette composition :

- SsoFast[™]-EvaGreen[®] SuperMix (2X stock) : 10 μ L
- Amorce sens (stock à 5 μ M) : 1 μ L
- Amorce antisens (stock à 5 μ M) : 1 μ L
- H₂O RNase Free : 6 μ L

Après dépôt des 18 μ L du mélange réactionnel, 2 μ L d'ADNc préalablement dilués au 1/10^{ème} sont ajoutés amenant le volume final à 20 μ L. Le programme de PCR utilisé comprend 45 cycles d'amplification comme décrit ci-dessous (une étape préalable de 30 secondes à 95 °C permet d'activer la polymérase) :

- Dénaturation des ADN double brins à 95 °C (4 secondes)
- Hybridation des amorces sur leur séquence cible et amplification par la polymérase (4 secondes) à la température correspondant aux T_m des amorces utilisées. La mesure de fluorescence de chaque puits est faite à la fin de cette étape.

La température d'hybridation est dépendante du T_m des différents couples d'amorces, aussi la majorité des qPCR est réalisée avec une température d'hybridation de 58 °C pour maximiser l'efficacité de fixation des amorces.

A la fin des cycles d'amplification, un gradient de température est appliqué avec mesure de la fluorescence à chaque incrément de température afin de tracer une courbe de dissociation par puits. En effet, l'augmentation de la température conduit à la diminution de la fluorescence par dissociation des deux brins d'ADN et libération de l'intercalant fluorescent. L'analyse de la courbe de dissociation ne doit faire apparaître qu'une seule température à laquelle la fluorescence subit une forte décroissance, nous assurant de la présence d'un seul amplicon.

Les résultats sont analysés grâce au logiciel CFX Manager™ (Bio-rad). L'appareil mesure pour chaque puits une valeur appelée Ct (*Cycle Threshold*) qui correspond au nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence du puits atteigne un seuil préalablement défini (idéalement situé entre le bruit de fond et le début de la phase exponentielle du signal). Dès lors, après avoir normalisé la valeur de ce Ct d'un gène d'intérêt pour une condition donnée par la valeur de Ct du gène *RPLP0* (gène de ménage utilisé), la méthode de calcul dite des $\Delta\Delta Ct$ est réalisée pour comparer les variations d'expression génique entre deux conditions. Le différentiel obtenu correspond au nombre de cycles de PCR d'écart entre les deux conditions. Un cycle de PCR aboutissant théoriquement à deux fois plus de matériel, le différentiel d'expression entre les deux conditions étudiées peut-être quantifié par la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Nom du gène		Séquence 5' → 3'	Température d'hybridation (°C)	Taille de l'amplicon (pb)
ALDH1A3	Sens	TGAATGGCACGAATCCAAGAG	58,6	100
	Antisens	CACGTCGGGCTTATCTCCT	58,9	
AMOT	Sens	AGGCAAGAGTTGGAAGGATGC	60,6	106
	Antisens	AGGATGACTTCACGAGGTTCT	58,5	
ANKRD1	Sens	AGTAGAGGAACTGGTCACTGG	58,5	138
	Antisens	TGGGCTAGAAGTGTCTTCAGAT	58,6	
AXL	Sens	GTTTGGAGCTGTGATGGAAGGC	54,5	121
	Antisens	CGCTTCACTCAGGAAATCCTCC	54,5	
Cyclin E1	Sens	ACTCAACGTGCAAGCCTCG	61	141
	Antisens	GCTCAAGAAAGTGCTGATCCC	59,3	
CD24	Sens	AACTAATGCCACCACCAAGG	58,1	188

	Antisens	CCTGTTTTTCCTTGCCACAT	56,8	
CD44	Sens	CGGACACCATGGACAAGTTT	58,4	176
	Antisens	GAAAGCCTTGCAGAGGTCAG	58,8	
CD133	Sens	ACCCATTGGCATTCTCTTTG	56,3	199
	Antisens	CCCCAGGACACAGCATAGAA	59,1	
CD166	Sens	TCAAGGTGTTCAAGCAACCA	57,9	96
	Antisens	CTGAAATGCAGTACCCAAC	57,3	
C-Myc	Sens	TCTGTGGAAAAGAGGCAGGCTCC	64,6	125
	Antisens	TGCTGATGTGTGGAGACGTG	60,3	
CTGF	Sens	TTACCAATGACAACGCCTCCT	59,7	159
	Antisens	TGCAGCCAGAAAGCTCAAAC	59,3	
Cyr61	Sens	ACCGCTCTGAAGGGGATCT	60	109
	Antisens	ACTGATGTTTACAGTTGGGCTG	58,9	
Ki67	Sens	GCCTGCTCGACCCTACAGA	61,1	127
	Antisens	GCTTGTCAACTGCGGTTGC	60,7	
RPLP0	Sens	GCAATGTTGCCAGTGTCTG	57,5	142
	Antisens	GCCTTGACCTTTTCAGCAA	56,3	
YAP	Sens	TAGCCCTGCGTAGCCAGTTA	60,7	177
	Antisens	TCATGCTTAGTCCACTGTCTGT	59,1	
TAZ	Sens	GGCTGGGAGATGACCTCAC	60,1	252
	Antisens	CTGAGTGGGGTGGTTCTGCT	61,8	
Yes	Sens	GTGTCACCATGTCCGTCATCT	60	98
	Antisens	AAAGGCGTTACCCCTGAGGAT	61,2	

Table n°15: Liste des primers utilisés pour les RT-qPCR au cours de ce travail de Thèse. Les valeurs de Tm ainsi que la taille de l'amplicon ont été déterminées avec le logiciel *primerblast*.

Production d'un plasmide rapporteur TEAD-Luciférase

Pour étudier l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription TEAD, un plasmide (vecteur pGL3 basic) 8xGTIIC-luciférase a été généré (Dupont et al., 2011). Ce plasmide contient la séquence d'ADN codant pour la luciférase placé sous le contrôle d'un

promoteur contenant 8 éléments de réponse TEAD (le motif de fixation des facteurs de transcription TEAD est 5'-ACATTCCA-3'). Le plasmide contient également la cassette de résistance à l'Ampicilline permettant sa production en bactérie.

Culture bactérienne

Pour permettre la production et l'amplification des plasmides utilisés, nous utilisons la souche *Escherichia coli* JM109 (Promega). La transformation des bactéries (50 µL de souche bactérienne) par le plasmide d'intérêt se fait par choc thermique (la suspension plasmide/bactéries est mise à incuber dans un bain marie à 42 °C pendant 45 secondes, puis immédiatement placée sur glace). Un volume d'1 mL de milieu SOC est ajouté au mélange puis l'ensemble est incubé à 37 °C pendant 1 heure avant étalement sur matrice LB (*Lysogeny Broth*)-Agar avec antibiotique de sélection (en l'occurrence de l'Ampicilline à 50µg/mL pour le plasmide rapporteur TEAD). Le lendemain, des colonies isolées sont sélectionnées et mises en culture sur la nuit à 37 °C, sous agitation (dans 200 mL de milieu LB avec antibiotique de sélection) pour permettre l'extraction et le séquençage des plasmides purifiés.

Extraction et purification du plasmide

En fonction de la quantité de plasmide purifié souhaitée, deux méthodes d'extraction et de purification peuvent être effectuées : *mini* ou *maxi prep* (Qiagen). Les protocoles ne divergent principalement que par le volume et la quantité de plasmides élués en titration finale. La *mini prep* permet d'obtenir une petite quantité de plasmide, suffisante pour le séquençage. Une extraction avec le *kit maxi prep* nécessite plus de matériel bactérien avant extraction. L'on obtient après extraction une quantité de plasmide plus conséquente (avoisinant le milligramme de plasmides purifiés) pour une grande série de transfections. Les kits d'extraction de plasmide utilisés éliminent les endotoxines bactériennes, permettant l'utilisation des plasmides purifiés sur cellules.

La suspension bactérienne incubée sous agitation sur nuit dans un volume de 200 mL de LB + antibiotique de sélection est récupérée et transvasée dans un tube de 250 mL avec bouchon étanche, pour être ensuite centrifugée (6000 g, 15 min, 4 °C) afin de culoter les bactéries. Le culot est repris dans un tampon de lyse, permettant la libération du contenu bactérien et des plasmides produits. Après précipitation des acides nucléiques, le contenu est

déposé sur colonne d'affinité et les plasmides sont élués après plusieurs étapes de rinçage avec les tampons du kit éliminant les débris bactériens. Les plasmides purifiés sont dosés au Nanodrop puis envoyés en séquençage (séquençage réalisé chez *GATC*) afin de vérifier la séquence de la construction contenue dans le plasmide.

D. Biochimie

Analyse protéique

Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales est réalisée par lyse des cellules sur leur support de culture. Le milieu de culture est aspiré, le tapis cellulaire est rincé avec du D-PBS 1X qui est ensuite aspiré. En fonction de la surface de culture (puits de plaque 6 puits, t25 ou t75) un volume de tampon de lyse est ajouté sur le tapis cellulaire (un volume de moins de 300 µL de tampon de lyse doit être utilisé pour éviter d'avoir des lysats protéiques trop dilués).

Le tampon de lyse est un tampon base RIPA 1X (Sigma Aldrich) auquel est ajouté une pastille d'inhibiteurs de protéases *Complete™ PIC (Protease Inhibitor Cocktail, Roche)* à raison d'une pastille pour 10 mL de tampon de lyse. Des inhibiteurs de phosphatases sont également ajoutés à une concentration finale de 1 mM : fluorure de sodium (inhibiteur de tyrosine phosphatase, Sigma Aldrich) et orthovanadate de sodium (inhibiteur de sérine/thréonine phosphatase, Sigma Aldrich). Le tapis cellulaire en contact du tampon de lyse est décollé manuellement avec un grattoir et le lysat est collecté dans un tube à centrifuger de 15 mL. Une lyse mécanique par aspirations/refoulements au travers d'une aiguille 21G (Terumo) est réalisée avant centrifugation à 4 °C (5000 g, 10 minutes) afin de séparer le surnageant contenant les protéines du culot contenant les débris cellulaires. Les lysats sont conservés à -80 °C avant dosage et électrophorèse.

Extraction des fractions nucléiques et cytoplasmiques

Pour avoir assez de matériel protéique de chacune des deux fractions séparées, les ensemencements cellulaires sont effectués en t75. Toutes les étapes et les centrifugations sont réalisées sur glace ou à 4 °C.

Les cellules sont décollées à l'aide d'un grattoir directement dans le milieu de culture, puis transvasées dans un tube à centrifuger de 50 mL. Un volume de 10 mL de D-PBS-1X est

utilisé pour rincer la t75 et récupérer le maximum de cellules. Les cellules sont centrifugées à 500 g pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 1 mL de D-PBS-1X et est transféré dans un microtube de 1,5 mL ; ce tube est centrifugé à 9000 g pendant 5 minutes et le culot est remis en suspension dans 500 µL de D-PBS-1X, puis à nouveau centrifugé comme décrit précédemment.

Les tampons utilisés pour préparer les solutions d'extraction pour la séparation biochimique des noyaux du cytoplasme sont précisés dans le tableau ci-dessous. La préparation des solutions de travail à partir des tampons est réalisée en extemporané (les tampons conservés à 4°C sont stables plusieurs mois).

Composition des tampons :

Tampon A : HEPES/KOH 10 mM, pH 7,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM

Tampon C : HEPES/KOH 20 mM, pH 7,9, NaCl 420 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, glycérol 25 % (v/v)

Tampon D : HEPES/KOH 20 mM, pH 7,9, KCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, glycérol 20 % (v/v)

Composition des solutions de travail :

Solution A : tampon A + Leupeptine (10 µg/mL) et Aprotinine (10µg/mL)

Solution A' : tampon A + Leupeptine (10 µg/mL), Aprotinine (10µg/mL), Molybdate de sodium 0,1 mM, β-Glycérophosphate 10 mM, Fluorure de sodium 10 mM, Orthovanadate de sodium 0,1 mM, NP-40 0,1 % (v/v)

Solution C : tampon C + DTT 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, Leupeptine (10 µg/mL), Aprotinine (10µg/mL), Molybdate de sodium 0,1 mM, β-Glycérophosphate 10 mM, Fluorure de sodium 10 mM, Orthovanadate de sodium 0,1 mM

Solution D : tampon D + DTT 0,5 mM et PMSF 0,5 mM

Le culot cellulaire est repris par un volume d'un mL de solution A puis l'homogénat est centrifugé pendant 5 minutes à 9000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 150 µL de solution A'. L'homogénat est mis sur glace pendant 10 minutes avec agitation sur vortex au bout de 5 minutes. Au bout des 10 minutes sur glace, les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 14 000 g. Le surnageant contenant les protéines cytosoliques est récupéré; la totalité du surnageant n'est pas récupérée pour éviter toute contamination de la fraction cytosolique par des protéines nucléaires.

La fraction cytosolique récupérée est transférée dans un nouveau tube de 1,5 mL auquel on ajoute 225 µL de tampon D. Le reliquat du surnageant est éliminé avant de reprendre le culot contenant les noyaux avec 125 µL de tampon C qui est mis sur glace pendant 10 minutes (un vortex est réalisé au bout de 5 minutes). Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 14 000 g. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est transféré dans un nouveau tube de 1,5 mL auquel on ajoute 187,5 µL de tampon D.

Les fractions nucléaires et cytosoliques sont conservées à -80 °C avant dosage protéique et analyse par Western blot (voir les sections suivantes).

Co-Immunoprécipitation

La composition du tampon de lyse pour co-immunoprécipitation dépend des conditions d'interactions souhaitées : pour une protéine nucléaire, une étape de fractionnement cellulaire peut être réalisée préalablement suivant le protocole décrit ci-dessus. Pour une protéine avec une localisation subcellulaire ubiquitaire (ce qui est le cas pour YAP), la co-immunoprécipitation est réalisée sur un lysat total en tampon de lyse RIPA.

Avant toutes les étapes, une solution « *binding buffer* » est à préparer :

Composition du *binding buffer* (5X) :

5 M NaCl = 12,5 mL
1 M Tris HCl pH 7,5 = 12,5 mL
0,5 M EDTA pH 8,0 = 5 mL
10% NP40 = 12,5 mL
H₂O qsp 500 mL

Les billes (*EZview™ red protein A affinity gel*, Sigma-Aldrich) fixant la fraction cristallisable des anticorps doivent être reprises dans un volume équivalent de *binding buffer* 1X (Par condition, nous utilisons un mélange de 20 µL de solution de billes + 20 µL de *binding buffer*).

Après dosage du lysat, une quantité de protéines est prélevée (entre 100 et 500 µg) dans un microtube de 1,5 mL. Avant l'étape de co-IP, un « *preclearing* » du lysat est effectué. Pour cela, le lysat est incubé sur nuit à 4 °C et sous agitation avec 1 µg d'IgG correspondant à l'espèce de l'anticorps d'intérêt. Le lendemain, 40 µL de la solution de billes est ajouté, puis

ce mélange lysat/IgG/billes est laissé une heure sous agitation à 4°C. Un volume d'1 mL de *binding buffer* est ajouté et l'ensemble est centrifugé (8200 g, 5 min, 4°C). Le surnageant est récupéré et le culot (contenant toutes les protéines fixées de manière aspécifique par l'IgG non relevante ou directement par les billes) est éliminé.

Après cette étape de « nettoyage » du lysat, deux tubes par condition expérimentale sont préparés pour la co-IP ; l'un contiendra l'anticorps d'intérêt et l'autre l'IgG contrôle à la même concentration. Les deux tubes sont incubés sous agitation à 4 °C durant la nuit.

Anticorps	Référence
YAP	sc-15407 (H-125)
P-Tyr	sc-7020 (PY99)
Normal Rabbit IgG	Merck 12-370
Normal Mouse IgG	Merck 12-371

Tableau n°16 : Liste des anticorps et leurs contrôles isotypiques utilisés au cours des travaux pour les expériences de Co-Immuno-précipitation.

Le lendemain, les billes sont rincées comme préalablement décrit, puis un volume de 40 µL du mélange bille/*binding buffer* est ajouté au mélange lysat / anticorps. Les deux microtubes sont mis sous agitation pendant 1 heure à 4 °C. Un volume d'1 mL de *binding buffer* est ajouté par tube, puis les deux microtubes sont centrifugés (8200 g, 5 min, 4 °C). Le surnageant est éliminé en faisant attention de ne pas prélever les billes culotées. Cette étape de lavage est répétée entre 10 fois. A la fin du dernier lavage, du tampon NuPage™ LDS (tampon contenant du dodecylsulfate de lithium) et du tampon NuPage™ SRA (agent réducteur, Life Technologies) sont ajoutés en suivant les mêmes conditions que pour un *Western blot* classique. Les protéines ainsi éluées peuvent être déposées directement après dénaturation, ou être conservées à -80 °C pour dépôt ultérieur. Le lysat cellulaire non immunoprécipité servira de contrôle de charge (*Input*).

Dosage protéique

Le dosage des échantillons protéiques (totaux ou compartiments subcellulaires) est réalisé selon la méthode du dosage BCA (*BiCinchoninic acid Assay*, Pierce). Les protéines en milieu alcalin ayant la capacité de réduire les ions Cu^{2+} en Cu^+ , l'utilisation de l'acide bicinchoninique qui réagit à la présence du Cu^+ en formant un complexe pourpre dont l'absorbance peut être mesurée à 542 nm. L'utilisation d'une gamme d'albumine bovine (Sigma-Aldrich) de concentration connue (2 mg/mL) et dont l'absorbance est mesurée pour chaque point permet de tracer une courbe étalon sur laquelle l'absorbance d'un échantillon protéique donné va être rapportée afin d'évaluer sa concentration.

Western blotting

Avant dépôt et migration électrophorétique, les lysats protéiques sont préparés et dénaturés. Le lysat est complété par du tampon NuPage™ SRA (*sample reducing agent*, Life Technologies) contenant le DTT nécessaire à la réduction des ponts disulfure entre cystéines, ainsi que le tampon NuPage™ LDS. Le lysat est ensuite chauffé pendant 5 minutes à 100 °C au bain-marie pour permettre la dénaturation des protéines.

La migration électrophorétique est réalisée à l'aide des systèmes des cuves et des gels pré-coulés NuPage™ (Life Technologies). Deux références de gels sont utilisées en fonctions de la taille des protéines à étudier : les gels 4-12% bis-trisacrylamide pour les protéines entre 15 et 200 kDa et les gels 3-8% tris-acétate pour les protéines plus lourdes (avec une masse moléculaire supérieure à 300 kDa). La cuve de Western blot est remplie par du tampon de migration MOPS 1X. Le compartiment cathodique (délimité par les bords internes des plaques des gels) est quant à lui rempli par le tampon MOPS complété avec l'antioxydant (Life Technologies, 500 μL pour 200 mL de MOPS 1X). La migration se fait à tension constante de 160 V pendant 90 minutes.

Le transfert protéique est effectué par l'utilisation des kits de transfert rapide (*Life iBlot Gel Transfer Device*®) permettant la migration des protéines du gel vers la membrane de nitrocellulose en 7 minutes sous tension constantes de 30 V. La qualité du transfert des protéines est vérifiée par incubation de la membrane de nitrocellulose dans une solution de Rouge Ponceau 1X (Sigma-Aldrich), permettant la coloration aspécifique de l'ensemble des protéines. Après rinçage au TBS-Tween 0,1% (*Tris-Buffered Saline-Tween-X100*) 1X, la

membrane de nitrocellulose est saturée avec une solution de TBS-Tween 1X-lait 5% (p/v) pendant 2 heures sous agitation et à température ambiante.

Après saturation des sites aspécifiques, la membrane est incubée sur la nuit à 4°C dans la solution d'anticorps primaire spécifique de notre protéine d'intérêt. La dilution d'anticorps primaire peut être effectuée dans une solution TBS-Tween 1X-5 % de lait ou de sérumalbumine bovine, en fonction des recommandations du fournisseur. Les différents anticorps utilisés pour ce travail, la dilution de travail utilisée ainsi que les références commerciales sont spécifiées dans le tableau ci-dessous.

Cible	Masse moléculaire (kDa)	Facteur de dilution	Solution de saturation	Espèce	Référence et clone
YAP	65	1/200 ^{ème}	Lait	Lapin polyclonal	sc-15407 (H-125)
YAP/TAZ	65-50	1/500 ^{ème}	BSA	Lapin monoclonal	CST 8418 (D24E4)
Cyr61	41	1/200 ^{ème}	Lait	Lapin polyclonal	sc-13100 (H78)
β-Actin	42	1/5000 ^{ème}	X	Souris monoclonal	Sigma A3853 (AC-40)
Cyclin E1	48	1/200 ^{ème}	Lait	Souris monoclonal	sc-247 (HE12)
Cyclin A	54	1/200 ^{ème}	Lait	Lapin polyclonal	sc-576 (C-19)
C-Myc	58	1/500 ^{ème}	BSA	Lapin Monoclonal	CST 5605 (D84C12)
AXL	130	1/1000 ^{ème}	BSA	Lapin Monoclonal	CST 4566 (C44G1)
Survivin	16	1/1000 ^{ème}	BSA	Lapin Monoclonal	CST 2808 (71G4B7)
CREB	43	1/1000 ^{ème}	Lait	Lapin Monoclonal	CST 9197 (48H2)
P-CREB Ser133	43	1/500 ^{ème}	BSA	Lapin Polyclonal	R&D Systems AF 2510
P YAP Ser127	65	1/1000 ^{ème}	BSA	Lapin Polyclonal	CST 4911
CD166	95	1/500 ^{ème}	X	Souris Monoclonal	Novocastra (MOG/07)

Angiomotin	80-120	1/500 ^{ème}	BSA	Lapin Polyclonal	Abcam ab117776
CD44	> 120	1/1000 ^{ème}	Lait	Lapin Polyclonal	CST 3578
Cyclin D1	36	1/1000 ^{ème}	Lait	Souris Polyclonal	CST 2926
Yes	62	1/500 ^{ème}	Lait	Souris Monoclonal	BD Biosciences 610376
CTGF	37	1/200 ^{ème}	Lait	Chèvre Polyclonal	Sc 14939 (L-20)

Tableau n°17: Liste des anticorps utilisés au cours des travaux. La taille moléculaire attendue, le facteur de dilution ainsi que le tampon TBS (Lait 5 %, BSA 5 %, rien), l'espèce dans laquelle l'anticorps est produit ainsi que la référence sont précisés dans le tableau.

Après incubation sur la nuit dans la dilution de l'anticorps primaire, la membrane de nitrocellulose est rincée 3 fois par du TBS-T 1X sous agitation (10 minutes par rinçage). La membrane est ensuite incubée dans une solution d'anticorps secondaire spécifique de l'espèce hôte de l'anticorps primaire et couplé avec la peroxydase de Raifort (*Horseradish Peroxydase, HRP*, dilution au 1/5000 dans du TBS-T 1X). Après 3 rinçages au TBS-T 1X, la membrane est incubée pendant 5 minutes à l'obscurité avec la solution du kit *West Pico SuperSignal*[®] (Pierce).

A la fin de l'incubation, la membrane est placée entre deux feuilles de plastique transparent et est disposée dans l'appareil ImageQuant[™] Las4000 (Fujifilm). Le Luminol présent dans la solution *West Pico SuperSignal*[®] va être oxydé par la HRP présente sur les anticorps secondaires et conduire à l'émission de photons. Cette émission lumineuse va être captée par la caméra du système de détection Las4000. Une analyse densimétrique est effectuée par le logiciel *ImageJ*, permettant par condition d'effectuer un ratio entre l'intensité d'une protéine donnée et le contrôle de charge (β -actine).

Immunohistochimie

Immunohistochimie manuelle

Des fragments de métastases hépatiques ont été inclus dans la paraffine après fixation au Formol par le laboratoire d'Anatomopathologie du CHRU de Lille. Des lames sériées

d'épaisseur 4 μm sont préparées à partir des blocs inclus et sont utilisées pour le marquage immunohistochimique.

Pour les marquages de YAP/TAZ (anticorps référence Cell Signaling 8418), nous avons utilisé un protocole d'Immunohistochimie manuelle. Tout d'abord, le tissu doit être déparaffiné pour permettre le marquage. La lame contenant le tissu inclus est incubée dans plusieurs bains successifs:

- 2 bains de Xylène (5 min/bain)
- 2 bains d'éthanol 100% (5 min/bain)
- 1 bain éthanol 95 % (5 min)

Après le dernier bain d'éthanol, la lame est plongée dans l'eau pendant 5 minutes.

Les sites antigéniques sont démasqués par un chauffage au micro-onde pendant 20 minutes à la puissance de 700 W dans un tampon citrate 1X (Dako). Les lames sont refroidies dans un bain d'eau courante pendant 30 minutes. Le tissu est perméabilisé par une incubation dans une solution de TENG-T (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, gélatine 0,25 % (p/v), Tween 20 0,01 % (v/v)) diluée dans du D-PBS 1X, suivi de deux rinçages D-PBS 1X de 5 minutes. Les sites antigéniques sont ensuite saturés par une solution de BSA 3% dilué dans du D-PBS 1X pendant 30 minutes et suivi de 2 lavages avec du D-PBS 1X.

Les lames sont incubées sur la nuit dans une solution d'anticorps primaire dans du D-PBS-BSA 1% et mises à 4 °C. Le lendemain, la solution contenant l'anticorps primaire est éliminée des lames avant 4 rinçages successifs dans des bains de D-PBS 1X. Les peroxydases endogènes, sources de bruit de fond lors de la coloration sont désactivées par un bain de 30 minutes dans une solution d'eau oxygénée (Sigma Aldrich) 3 %, suivi de deux bains de D-PBS 1X de 5 minutes.

Après blocage des complexes avidine-biotine endogènes par utilisation du *Biotin Blocking System*[®] (Dako), les lames sont incubées pendant 1 heure par une solution d'anticorps secondaires biotinylés (anticorps anti-lapin dilué au 1/2000^{ème}, Vector). L'incubation est suivie par 4 rinçages des lames par du D-PBS 1X. L'amplification du signal est effectuée par l'utilisation du kit *Vectastain Elite*[®] avidine-biotine couplée à la HRP peroxydase (Vector). Cette étape est réalisée pendant 30 minutes à température ambiante. Pendant l'incubation, le

substrat de la HRP, la 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich) est solubilisée dans du D-PBS 1X en suivant les recommandations du fournisseur. Un volume de 100 µL de DAB est déposé sur chaque lame ; l'apparition du marquage (reflet de l'oxydation de la DAB par la HRP en un composé de couleur marron) est suivie sous microscope pour pouvoir arrêter la réaction enzymatique à un temps précis par immersion des lames dans de l'eau déminéralisée ; la série de lames est incubée avec la DAB sur ce même intervalle de temps pour que les observations d'intensité de marquage soient comparables.

Les noyaux des tissus sont contre-colorés en bleu par immersion dans un bain d'hématoxyline (Sigma-Aldrich) pendant 2 minutes. Les lames sont rincées à l'eau puis plongées pendant quelques secondes dans une solution de carbonate de lithium saturée, suivi de trois derniers rinçages à l'eau. Avant montage des lamelles sur les lames, le tissu marqué et contre-coloré est déshydraté par une série de bains:

- 1 bain éthanol 95 % (5 minutes)
- 2 bains d'éthanol 100 % (5 minutes/bain)
- 2 bains de Xylène (5 minutes/bain)

Après déshydratation du tissu, les lamelles sont montées sur lames à l'aide du liquide de montage Eukitt® (O-Kindler). Après la prise du liquide de montage et séchage des lames sous sorbonne pour permettre l'élimination du xylène résiduel, les lames sont analysées par les anatomopathologistes de notre équipe.

Immunohistochimie sur automate

L'étude de l'expression protéique du Ki67 a été réalisée sur une partie de la cohorte de patients analysés pour l'étude génique (n = 18). Pour ce marquage, nous avons utilisé l'automate Benchmark Ventana (Roche) avec un protocole préétabli par le service d'Anatomopathologie du Centre de BioPathologie du CHRU de Lille servant pour l'analyse en routine. L'anticorps MIB1 (Dako) est utilisé au 1/50^{ème} dans du tampon de dilution pour anticorps (Roche) et est ajouté manuellement sur les lames. Toutes les autres étapes du protocole décrit dans la partie IHC manuelle (déparaffinage, démasquage, etc) jusqu'à la déshydratation et le montage des lamelles sur les lames sont réalisées par l'automate avec les réactifs du fournisseur. La lecture des marquages est réalisée par des anatomopathologistes référents, permettant d'avoir une évaluation sur le pourcentage de cellules marquées.

Etude de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription TEAD par test luciférase

Pour étudier l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription TEAD, reflet de l'activité des complexes YAP/TAZ/TEAD, les cellules sont transfectées par le plasmide rapporteur TEAD-luc. Les cellules sontensemencées à raison de 500 000 cellules par puits de plaque 6 puits. La transfection du plasmide se fait avec le kit de transfection Effectene[®] (Qiagen). Pour une même condition (traitement par DMSO, Verteporfine etc) les cellules de 3 puits sont transfectées par le plasmide d'intérêt, 3 autres le sont par un plasmide rapporteur luciférase sous la dépendance d'un promoteur fort (SV40, Promega).

Lorsque la confluence du tapis cellulaire est proche de 50 %, la transfection est réalisée. Par puits, 1 µg du plasmide d'intérêt est dilué dans 100 µL qsp du tampon EC du kit Effectene[®]. Un volume de 3,2 µL de la solution Enhancer[®] est ajouté afin de permettre la compaction du plasmide ; le tube est alors mélangé par tapotement et le mélange est gardé à température ambiante pendant 5 minutes. Après centrifugation, 5 µL d'Effectene[®] sont ajoutés, puis le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante. Pendant cette dernière incubation, le milieu de culture des cellules est aspiré et est rincé avec du D-PBS 1X puis 1,4 mL de milieu frais est ajouté par puits de plaque 6 puits. A la fin de l'incubation de l'Effectene[®], 600 µL de milieu sont ajoutés au mélange plasmide/Enhancer[®]/Effectene[®] et est déposé au goutte à goutte dans le puits. Après 48 heures post-transfection, le tapis cellulaire est rincé avec du D-PBS 1X puis lysé par le tampon *Report Lysis Buffer* 1X (Promega). Le lysat est vortexé puis centrifugé 10 minutes (10 000 g, 4 °C) ; le surnageant est transféré dans un microtube de 1,5 mL avant analyse de l'activité luciférase.

Le dosage de l'activité luciférase de chaque condition est effectué avec le luminomètre Mithras LB940 (Berthold Technologies). Dans une plaque à fond opaque, 20 µL de lysat protéique sont déposés. La luciférine, substrat de la luciférase contenu dans la solution *Luciferase Assay Reagent* (Promega) est injectée par l'appareil à raison de 100 µL par puits. Après injection, la plaque est agitée pour homogénéiser le puits et l'émission lumineuse, reflet de l'activité enzymatique et donc de la production de luciférase par les cellules, est mesurée par l'appareil.

Les valeurs d'intensité lumineuse de chaque condition sont rapportées à la valeur d'intensité lumineuse produite par les cellules transfectées par le plasmide avec promoteur

fort (l'on exprime les valeurs de luciférase en pourcent du promoteur fort). Cette valeur est ensuite normalisée en fonction du dosage protéique de chaque condition.

E. Analyses statistiques des données

L'ensemble des analyses statistiques des données *in vitro* est effectuée grâce à l'outil intégré du logiciel *GraphPad Prism 5*[®] (GraphPad Software Inc). Les données sont représentées sous la forme de graphiques précisant la moyenne et l'écart-type à cette moyenne pour chaque condition. Le choix du test pour analyser l'écart entre moyennes est dépendant du nombre de groupes comparés ; pour une comparaison de moyennes entre deux échantillons, un test-t de Student est appliqué si les conditions paramétriques sont respectées. Si le test-t de Student ne peut être réalisé (n faible, distribution des valeurs peu homogène), une comparaison des rangs des médianes est réalisée par un test non paramétrique de Mann-Whitney. Pour une comparaison de la moyenne de plus de deux échantillons, un test d'analyse de variance (ANOVA) est effectué, avec un test *post-hoc* de Tukey. Une *p-value* est considérée comme significative si inférieure à 0,05 ; lorsque la variation est significative, elle est signalée sur le graphique par le symbole *, par le symbole ** si $p < 0,01$ et *** si $p < 0,001$.

Les courbes de survie globale et de survie sans récurrence tumorale ont été déterminées par la méthode de Kaplan-Meier et les comparaisons ont été réalisées par la méthode du log-rank. Les paramètres clinico-biologiques avec une *p-value* inférieure à 0,05 en univariée ont été inclus dans l'analyse multivariée pour la survie sans récurrence. Pour la survie globale, un modèle de régression de Cox a été utilisé en utilisant comme condition d'introduction d'une variable également une *p-value* inférieure à 0,05.

Bibliographie

A

Adam, R., and Vibert, E. (2014). Traitement des métastases hépatiques de cancer colorectal. *EMC Gastro-Enterologie* 2, 1–17.

Adam, R., Wicherts, D.A., De Haas, R., Ciaccio, O., Levi, F., Paule, B., Ducreux, M., Azoulay, D., Bismuth, H., and Castaing, D. (2009). Patients with initially unresectable colorectal liver metastases: Is there a possibility of cure? *J. Clin. Oncol.* 27, 1829–1835.

Ahmed, D., Eide, P.W., Eilertsen, I. a, Danielsen, S. a, Eknæs, M., Hektoen, M., Lind, G.E., and Lothe, R. a (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2, e71.

Aikawa, T., Gunn, J., Spong, S.M., Klaus, S.J., and Korc, M. (2006). Connective tissue growth factor-specific antibody attenuates tumor growth, metastasis, and angiogenesis in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 5, 1108–1116.

Akhtar Ali, M., Younis, S., Wallerman, O., Gupta, R., Andersson, L., and Sjöblom, T. (2015). Transcriptional modulator ZBED6 affects cell cycle and growth of human colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 201509193.

Andre, T., de Gramont, A., Vernerey, D., Chibaudel, B., Bonnetain, F., Tijeras-Raballand, A., Scriver, A., Hickish, T., Tabernero, J., Van Laethem, J.L., et al. (2015). Adjuvant Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Stage II to III Colon Cancer: Updated 10-Year Survival and Outcomes According to BRAF Mutation and Mismatch Repair Status of the MOSAIC Study. *J. Clin. Oncol.* 33, 4176–4187.

Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giullitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* 154, 1047–1059.

Asiedu, M.K., Beauchamp-perez, F.D., Ingle, J.N., Marshall, D., Radisky, D.C., and Knutson, K.L. (2014). AXL induces epithelial to mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene* 33, 1316–1324.

Azzolin, L., Zanconato, F., Bresolin, S., Forcato, M., Basso, G., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2012). Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* 151, 1443–1456.

Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., et al. (2014). YAP/TAZ incorporation in the beta-catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* 158, 157–170.

B

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 19–33.

Barker, N., Ridgway, R. a, van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., van den Born, M., Danenberg, E., Clarke, A.R., Sansom, O.J., and Clevers, H. (2009). Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* 457, 608–611.

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

Bartucci, M., Dattilo, R., Moriconi, C., Pagliuca, a, Mottolese, M., Federici, G., Benedetto, a Di, Todaro, M., Stassi, G., Sperati, F., et al. (2014). TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene* 1–10.

Basu, D., Lettan, R., Damodaran, K., Strellec, S., Reyes-Mugica, M., and Rebbaa, A. (2014). Identification, mechanism of action, and antitumor activity of a small molecule inhibitor of hippo, TGF- β , and Wnt signaling pathways. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1457–1467.

Best, J.L., Amezcua, C.A., Mayr, B., Flechner, L., Murawsky, C.M., Emerson, B., Zor, T., Gardner, K.H., and Montminy, M. (2004). Identification of small-molecule antagonists that inhibit an activator: coactivator interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17622–17627.

Bhat, K.P.L., Salazar, K.L., Balasubramaniyan, V., Wani, K., Heathcock, L., Hollingsworth, F., James, J.D., Gumin, J., Diefes, K.L., Kim, S.H., et al. (2011). The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes Dev.* 25, 2594–2609.

Boggon, T.J., and Eck, M.J. (2004). Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918–7927.

Boichuk, S., Parry, J.A., Makielski, K.R., Litovchick, L., Baron, J.L., Zewe, J.P., Wozniak, A., Mehalek, K.R., Korzeniewski, N., Seneviratne, D.S., et al. (2013). The DREAM complex mediates GIST cell quiescence and is a novel therapeutic target to enhance imatinib-induced apoptosis. *Cancer Res.* 73, 5120–5129.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737.

Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2013). Colorectal cancer. *Lancet* 6736, 1–13.

Budinska, E., Popovici, V., Tejpar, S., D’Ario, G., Lapique, N., Sikora, K.O., Di Narzo, A.F., Yan, P., Hodgson, J.G., Weinrich, S., et al. (2013). Gene expression patterns unveil a new level of molecular heterogeneity in colorectal cancer. *J. Pathol.* 231, 63–76.

C

Cai, J., Zhang, N., and Zheng, Y. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev.* 2383–2388.

Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2007). YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr. Biol.* 17, 2054–2060.

Campaner, S., Viale, A., De Fazio, S., Doni, M., De Franco, F., D’Artista, L., Sardella, D., Pelicci, P.G., and Amati, B. (2013). A non-redundant function of cyclin E1 in hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 12, 3663–3672.

Cardwell, C.R., Hicks, B.M., Hughes, C., and Murray, L.J. (2014). Statin Use after colorectal cancer diagnosis and survival: A population-based cohort study. *J. Clin. Oncol.* 32, 3177–3183.

- Castellone, M.D., and Teramoto, H. (2005). Prostaglandin E 2 Promotes Colon Cancer Cell Growth Through a G s -Axin- b -Catenin Signaling Axis. *Science* 1504–1511.
- Chen, J., and Harris, R.C. (2015). Interaction of the EGF Receptor and the Hippo Pathway in the Diabetic Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1689–1700.
- Chen, M., Wang, M., Xu, S., Guo, X., and Jiang, J. (2015). Upregulation of miR-181c contributes to chemoresistance in pancreatic cancer by inactivating the Hippo signaling pathway. *Oncotarget* 6, 44466–44479.
- Chen, M.H., Weng, J.J., Cheng, C.T., Wu, R.C., Huang, S.C., Wu, C.E., Chung, Y.H., Liu, C.Y., Chang, M.H., Chen, M.H., et al. (2016). ALDH1A3, the major aldehyde dehydrogenase isoform in human cholangiocarcinoma cells, affects prognosis and gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma patients. *Clin. Cancer Res.* 22, 4225–4235.
- Cheng, P., Wang, J., Waghmare, I., Sartini, S., Coviello, V., Kim, S., Mohyeldin, A., Pavlyukov, M.S., Zhang, Z., Minata, M., et al. (2016). FOXD1-ALDH1A3 signaling is a determinant for the self-renewal and tumorigenicity of mesenchymal glioma stem cells. *Cancer Res.* 58, 7250–7257.
- Chu, S., McDonald, T., Lin, A., Chakraborty, S., Huang, Q., Snyder, D.S., and Bhatia, R. (2011). Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood* 118, 5565–5572.
- Chunling Yi, Zhewei Shen, Anat Stemmer-Rachamimov, Noor Dawany, Scott Troutman, Louise C. Showe, Qin Liu, Akihiko Shimono, Marius Sudol, L., and Holmgren, Ben Z. Stanger, and J.L.K. (2013). The p130 Isoform of Angiomotin Is Required for Yap-Mediated Hepatic Epithelial Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Sci. Signal.* 44, 735–745.
- Cioffi, M., Trabulo, S.M., Sanchez-Ripoll, Y., Miranda-Lorenzo, I., Lonardo, E., Dorado, J., Reis Vieira, C., Ramirez, J.C., Hidalgo, M., Aicher, A., et al. (2015). The miR-17-92 cluster counteracts quiescence and chemoresistance in a distinct subpopulation of pancreatic cancer stem cells. *Gut* gutjnl-2014-308470-.
- Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A.R., Poletti, A., et al. (2011). The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 147, 759–772.
- Couderc, C., Boin, A., Fuhrmann, L., Vincent-Salomon, A., Mandati, V., Kieffer, Y., Mechta-Grigoriou, F., Del Maestro, L., Chavrier, P., Vallerand, D., et al. (2016). AMOTL1 Promotes Breast Cancer Progression and Is Antagonized by Merlin. *Neoplasia (United States)* 18, 10–24.
- Couzens, A.L., Knight, J.D.R., Kean, M.J., Teo, G., Weiss, A., Dunham, W.H., Lin, Z.-Y., Bagshaw, R.D., Sicheri, F., Pawson, T., et al. (2013). Protein Interaction Network of the Mammalian Hippo Pathway Reveals Mechanisms of Kinase-Phosphatase Interactions. *Sci. Signal.* 6, rs15-rs15.
- Cox, Goessling, Houvras, Stainier, and Hwang (2016). Yap reprograms glutamine metabolism to increase nucleotide biosynthesis and enable liver growth. *Nat. Cell Biol.* 18.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 351, 337–345.
- Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausová, J., Macarulla, T., Ruff, P., Van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D., et al. (2012). Addition of aflibercept to fluorouracil,

leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J. Clin. Oncol.* *30*, 3499–3506.

D

Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., et al. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10158–10163.

Dallas, N.A., Xia, L., Fan, F., Gray, M.J., Gaur, P., Van Buren, G., Samuel, S., Kim, M.P., Lim, S.J., and Ellis, L.M. (2009). Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res.* *69*, 1951–1957.

Daniel, P., Filiz, G., Brown, D. V, Hollande, F., Gonzales, M., D'Abaco, G., Papalexis, N., Phillips, W.A., Malaterre, J., Ramsay, R.G., et al. (2014). Selective CREB-dependent cyclin expression mediated by the PI3K and MAPK pathways supports glioma cell proliferation. *Oncogenesis* *3*, e108.

Dessein, A.-F., Stechly, L., Jonckheere, N., Dumont, P., Monté, D., Leteurtre, E., Truant, S., Pruvot, F.-R., Figeac, M., Hebbar, M., et al. (2010). Autocrine induction of invasive and metastatic phenotypes by the MIF-CXCR4 axis in drug-resistant human colon cancer cells. *Cancer Res.* *70*, 4644–4654.

Desurmont, T., Skrypek, N., Duhamel, A., Jonckheere, N., Millet, G., Leteurtre, E., Gosset, P., Duchene, B., Ramdane, N., Hebbar, M., et al. (2015). Overexpression of chemokine receptor CXCR2 and ligand CXCL7 in liver metastases from colon cancer is correlated to shorter disease-free and overall survival. *Cancer Sci.* *106*, 262–269.

Díaz-Martín, J., López-García, M.Á., Romero-Pérez, L., Atienza-Amores, M.R., Pecero, M.L., Castilla, M.Á., Biscuola, M., Santón, A., and Palacios, J. (2015). Nuclear TAZ expression associates with the triple-negative phenotype in breast cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *22*, 443–454.

Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M., Anders, R.A., Maitra, A., and Pan, D. (2007). Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in *Drosophila* and Mammals. *Cell* *130*, 1120–1133.

Douillard, J.Y., Siena, S., Cassidy, J., Tabernero, J., Burkes, R., Barugel, M., Humblet, Y., Bodoky, G., Cunningham, D., Jassem, J., et al. (2010). Randomized, Phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME study. *J. Clin. Oncol.* *28*, 4697–4705.

Drost, J., van Jaarsveld, R.H., Ponsioen, B., Zimmerlin, C., van Boxtel, R., Buijs, A., Sachs, N., Overmeer, R.M., Offerhaus, G.J., Begthel, H., et al. (2015). Sequential cancer mutations in cultured human intestinal stem cells. *Nature* *521*, 43–47.

Dubois, F., Keller, M., Calvayrac, O., Soncin, F., Hoa, L., Hergovich, A., Parrini, M.C., Mazieres, J., Vaisse-Lesteven, M., Camonis, J., et al. (2016). RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. *Cancer Res.* *76*, 1627–1640.

Dunne, P.D., Mcart, D.G., Blayney, J.K., Kalimutho, M., Greer, S., Wang, T., Srivastava, S., Ong, C.W., Arthur, K., Loughrey, M., et al. (2014). AXL Is a Key Regulator of Inherent and Chemotherapy- Induced Invasion and Predicts a Poor Clinical Outcome in Early-Stage Colon Cancer. *Clin. Cancer Res.* *20*, 164–176.

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179–183.

Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.-K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S., et al. (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. *PLoS One* 3, e2428.

E

van Engeland, M., Roemen, G.M.J.M., Brink, M., Pachen, M.M.M., Weijnenberg, M.P., de Bruïne, A.P., Arends, J.-W., van den Brandt, P. a, de Goeij, A.F.P.M., and Herman, J.G. (2002). K-ras mutations and RASSF1A promoter methylation in colorectal cancer. *Oncogene* 21, 3792–3795.

F

Fan, F., He, Z., Kong, L.-L., Chen, Q., Yuan, Q., Zhang, S., Ye, J., Liu, H., Sun, X., Geng, J., et al. (2016). Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration. *Sci. Transl. Med.* 8, 352ra108.

Fan, R., Kim, N.-G., and Gumbiner, B.M. (2013). Regulation of Hippo pathway by mitogenic growth factors via phosphoinositide 3-kinase and phosphoinositide-dependent kinase-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 2569–2574.

Fearon, E.R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 6, 479–507.

Feng, X., Degese, M.S., Iglesias-bartolome, R., Vaque, J.P., Molinolo, A., Rodrigues, M., Zaidi, M.R., Ksander, B.R., Merlino, G., Chen, Q., et al. (2014). Hippo-Independent Activation of YAP by the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene through a Trio-regulated Rho GTPase Signaling Circuitry. *Cancer Cell* 25, 831–845.

Fernandez-L, A., Northcott, P.A., Dalton, J., Fraga, C., Ellison, D., Angers, S., Taylor, M.D., and Kenney, A.M. (2009). YAP1 is amplified and up-regulated in hedgehog-associated medulloblastomas and mediates Sonic hedgehog-driven neural precursor proliferation. *Genes Dev.* 23, 2729–2741.

Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S.F., and Wang, H.L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J. Gastrointest. Oncol.* 3, 153–173.

Fossdal, R., Jonasson, F., Kristjansdottir, G.T., Kong, A., Stefansson, H., Gosh, S., Gulcher, J.R., and Stefansson, K. (2004). A novel TEAD1 mutation is the causative allele in Sveinsson's chorioretinal atrophy (helicoid peripapillary chorioretinal degeneration). *Hum. Mol. Genet.* 13, 975–981.

G

Gaffney, C.J., Oka, T., Mazack, V., Hilman, D., Gat, U., Muramatsu, T., Inazawa, J., Golden, A., Carey, D.J., Farooq, A., et al. (2012). Identification, basic characterization and evolutionary analysis of differentially spliced mRNA isoforms of human YAP1 gene. *Gene* 509, 215–222.

Gallagher, D.J., and Kemeny, N. (2010). Metastatic Colorectal Cancer: From Improved Survival to Potential Cure. *Oncology* 78, 237–248.

Gandhirajan, R.K., Jain, M., Walla, B., Johnsen, M., Batram, M.P., Huynh Anh, M., Rinschen, M.M., Benzing, T., and Schermer, B. (2016). Cysteine S-glutathionylation Promotes Stability and Activation of the Hippo Downstream Effector Transcriptional Co-activator with PDZ-binding Motif (TAZ). *J.*

Biol. Chem. jbc.M115.712539.

Gao, P., Song, Y., Wang, Z., Xu, Y., Tong, L., Sun, J., Yu, M., and Xu, H. (2013). Is the prediction of prognosis not improved by the seventh edition of the TNM classification for colorectal cancer? Analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database. *BMC Cancer* 13, 123.

Gao, Y.-B., Chen, Z.-L., Li, J.-G., Hu, X.-D., Shi, X.-J., Sun, Z.-M., Zhang, F., Zhao, Z.-R., Li, Z.-T., Liu, Z.-Y., et al. (2014). Genetic landscape of esophageal squamous cell carcinoma. *Nat. Genet.* 46, 1097–1102.

Geng, Y., Yu, Q., Whoriskey, W., Dick, F., Tsai, K.Y., Ford, H.L., Biswas, D.K., Pardee, a B., Amati, B., Jacks, T., et al. (2001). Expression of cyclins E1 and E2 during mouse development and in neoplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13138–13143.

Geng, Y., Yu, Q., Sicinska, E., Das, M., Gardner, H., and Sicinski, P. (2003). Cyclin E Ablation in the Mouse cellular mitogens. Once induced, D type cyclins associ. *Cell* 114, 431–443.

Geng, Y., Lee, Y.M., Welcker, M., Swanger, J., Zagozdzon, A., Winer, J.D., Roberts, J.M., Kaldis, P., Clurman, B.E., and Sicinski, P. (2007). Kinase-Independent Function of Cyclin E. *Mol. Cell* 25, 127–139.

Giantonio, B.J., Catalano, P.J., Meropol, N.J., O'Dwyer, P.J., Mitchell, E.P., Alberts, S.R., Schwartz, M.A., and Benson, A.B. (2007). Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J. Clin. Oncol.* 25, 1539–1544.

Gibault, F., Corvaisier, M., Bailly, F., Huet, G., Melnyk, P., and Cotelle, P. (2016). Non-Photoinduced Biological Properties of Verteporfin. *Curr. Med. Chem.* 1–14.

Graham, S.M. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319–325.

Gregorieff, A., Liu, Y., Inanlou, M.R., Khomchuk, Y., and Wrana, J.L. (2015). Yap-dependent reprogramming of Lgr5+ stem cells drives intestinal regeneration and cancer. *Nature* 526, 715–718.

Grothey, A., Van Cutsem, E., Sobrero, A., Siena, S., Falcone, A., Ychou, M., Humblet, Y., Bouché, O., Mineur, L., Barone, C., et al. (2013). Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): An international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 381, 303–312.

Guerrant, W., Kota, S., Troutman, S., Mandati, V., Fallahi, M., Stemmer-Rachamimov, A., and Kissil, J.L. (2016). Yap mediates tumorigenesis in neurofibromatosis type 2 by promoting cell survival and proliferation through a COX-2-EGFR signaling axis. *Cancer Res.* 76, 3507–3519.

Guinney, J., Dienstmann, R., Wang, X., de Reyniès, A., Schlicker, A., Soneson, C., Marisa, L., Roepman, P., Nyamundanda, G., Angelino, P., et al. (2015). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med.* 21.

Guo, C., Tommasi, S., Liu, L., Yee, J.K., Dammann, R., and Pfeifer, G. (2007). RASSF1A Is Part of a Complex Similar to the Drosophila Hippo/Salvador/Lats Tumor-Suppressor Network. *Curr. Biol.* 17, 700–705.

Guo, C., Zhang, X., and Pfeifer, G.P. (2011). The tumor suppressor RASSF1A prevents dephosphorylation of the mammalian STE20-like kinases MST1 and MST2. *J. Biol. Chem.* 286,

6253–6261.

H

Han, M., and Curley, A. (1996). colorectal carcinoma liver metastases . *Clin. Cancer Res.* *60*, 1397–1404.

Han, J.S., Macarak, E., Rosenbloom, J., Chung, K.C., and Chaqour, B. (2003). Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways: Role of CREB and AP-1 transcription factors. *Eur. J. Biochem.* *270*, 3408–3421.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hansen, C.G., Ng, Y.L.D., Lam, W.-L.M., Plouffe, S.W., and Guan, K.-L. (2015). The Hippo pathway effectors YAP and TAZ promote cell growth by modulating amino acid signaling to mTORC1. *Cell Res.* *25*, 1299–1313.

Haskins, J.W., Nguyen, D.X., and Stern, D.F. (2014). Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration. *Sci. Signal.* *55*, 1–11.

Hata, S., Hirayama, J., Kajiho, H., Nakagawa, K., Hata, Y., Katada, T., Furutani-Seiki, M., and Nishina, H. (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. *J. Biol. Chem.* *287*, 22089–22098.

Hau, J.C., Erdmann, D., Mesrouze, Y., Furet, P., Fontana, P., Zimmermann, C., Schmelzle, T., Hofmann, F., and Chène, P. (2013). The TEAD4-YAP/TAZ Protein-Protein Interaction: Expected Similarities and Unexpected Differences. *ChemBioChem* *14*, 1218–1225.

Hiemer, S.E., Szymaniak, A.D., and Varelas, X. (2014). The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor beta-induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* *289*, 13461–13474.

Hilman, D., and Gat, U. (2011). The evolutionary history of YAP and the Hippo/YAP pathway. *Mol. Biol. Evol.* *28*, 2403–2417.

Hong, W. and G.K.-L. (2013). The YAP and TAZ transcription coactivators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Semin Cell Dev Biol* *30*, 687–695.

Hossain, Z., Ali, S.M., Ko, H.L., Xu, J., Ng, C.P., Guo, K., Qi, Z., Ponniah, S., Hong, W., and Hunziker, W. (2007). Glomerulocystic kidney disease in mice with a targeted inactivation of Wwtr1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 1–6.

Hsu, Y.-L., Hung, J.-Y., Chou, S.-H., Huang, M.-S., Tsai, M.-J., Lin, Y.-S., Chiang, S.-Y., Ho, Y.-W., Wu, C.-Y., and Kuo, P.-L. (2015). Angiotensin decreases lung cancer progression by sequestering oncogenic YAP/TAZ and decreasing Cyr61 expression. *Oncogene* *34*, 4056–4068.

Hua, K., Jin, J., Zhao, J., Song, J., Song, H., Li, D., Maskey, N., Zhao, B., Wu, C., Xu, H., et al. (2016). miR-135b, upregulated in breast cancer, promotes cell growth and disrupts the cell cycle by regulating LATS2. *Int. J. Oncol.* *48*, 1997–2006.

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog

of YAP. *Cell* 122, 421–434.

Huang, J.-M., Nagatomo, I., Suzuki, E., Mizuno, T., Kumagai, T., Berezov, a, Zhang, H., Karlan, B., Greene, M.I., and Wang, Q. (2013). YAP modifies cancer cell sensitivity to EGFR and survivin inhibitors and is negatively regulated by the non-receptor type protein tyrosine phosphatase 14. *Oncogene* 32, 2220–2229.

Hurwitz, H., Fehrenbacher, L., Novotny, W., Cartwright, T., Hainsworth, J., Heim, W., Berlin, J., Baron, A., Griffing, S., Holmgren, E., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350, 2335–2342.

I

Imajo, M., Miyatake, K., Iimura, A., Miyamoto, A., and Nishida, E. (2012). A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling. *EMBO J.* 31, 1109–1122.

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

Impey, S., McCorkle, S.R., Cha-Molstad, H., Dwyer, J.M., Yochum, G.S., Boss, J.M., McWeeney, S., Dunn, J.J., Mandel, G., and Goodman, R.H. (2004). Defining the CREB RegulonA Genome-Wide Analysis of Transcription Factor Regulatory Regions. *Cell* 119, 1041–1054.

INCa (2011). La situation du cancer en France en 2011.

J

Jang, E.J., Jeong, H., Han, K.H., Kwon, H.M., Hong, J.-H., and Hwang, E.S. (2012). TAZ suppresses NFAT5 activity through tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 32, 4925–4932.

Janni, W., Vogl, F.D., Wiedswang, G., Synnestvedt, M., Fehm, T., Jückstock, J., Borgen, E., Rack, B., Braun, S., Sommer, H., et al. (2011). Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. *Clin. Cancer Res.* 17, 2967–2976.

Jasperson, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., Burt, R.W., Manuscript, A., Switches, M., Two, B., and Distinct, F. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology* 138, 2044–2058.

Jass, J.R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50, 113–130.

Jeong, W., Kim, S.B., Sohn, B.H., Park, Y.Y., Park, E.S., Kim, S.C., Kim, S.S., Johnson, R.L., Birrer, M., Bowtell, D.S.L., et al. (2014). Activation of YAP1 is associated with poor prognosis and response to taxanes in ovarian cancer. *Anticancer Res.* 34, 811–818.

Jess, T., Simonsen, J., Jorgensen, K.T., Pedersen, B.V., Nielsen, N.M., and Frisch, M. (2012). Decreasing risk of colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease over 30 years. *Gastroenterology* 143, 375–381.

Jiang, W.G., Watkins, G., Douglas-Jones, A., Holmgren, L., and Mansel, R.E. (2006a). Angiomotin and angiomotin like proteins, their expression and correlation with angiogenesis and clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer* 6, 16.

Jiang, Z., Li, X., Hu, J., Zhou, W., Jiang, Y., Li, G., and Lu, D. (2006b). Promoter hypermethylation-

mediated down-regulation of LATS1 and LATS2 in human astrocytoma. *Neurosci. Res.* 56, 450–458.

Jiao, S., Wang, H., Shi, Z., Dong, A., Zhang, W., Song, X., He, F., Wang, Y., Zhang, Z., Wang, W., et al. (2014). A Peptide Mimicking VGLL4 Function Acts as a YAP Antagonist Therapy against Gastric Cancer. *Cancer Cell* 25, 166–180.

Johnson, R., and 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.

Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., and Bryant, P.J. (1995). The *Drosophila* Tumor-Suppressor Gene *Warts* Encodes a Homolog of Human Myotonic-Dystrophy Kinase and Is Required for the Control of Cell-Shape and Proliferation. *Genes Dev.* 9, 534–546.

K

Kanai, F., Marignani, P.A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R.A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L.C., et al. (2000). TAZ : a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* 19.

Karapetis, C., Khambata-Ford, S., Jonker, D., and Al, E. (2008). K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 1317–1329.

Keshet, R., Adler, J., Ricardo Lax, I., Shanzer, M., Porat, Z., Reuven, N., and Shaul, Y. (2014). c-Abl antagonizes the YAP oncogenic function. *Cell Death Differ.* 22, 1–11.

Kim, T., Yang, S.-J., Hwang, D., Song, J., Kim, M., Kyum Kim, S., Kang, K., Ahn, J., Lee, D., Kim, M.-Y., et al. (2015). A basal-like breast cancer-specific role for SRF-IL6 in YAP-induced cancer stemness. *Nat. Commun.* 6, 10186.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.

Kitagawa, M. (2007). A Sveinsson's chorioretinal atrophy-associated missense mutation in mouse *Tead1* affects its interaction with the co-factors YAP and TAZ. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361, 1022–1026.

Kobayashi, S., Yamada-Okabe, H., Suzuki, M., Natori, O., Kato, A., Matsubara, K., Chen, Y.J., Yamazaki, M., Funahashi, S., Yoshida, K., et al. (2012). LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells* 30, 2631–2644.

Koegl, M., Zlatkine, P., Ley, S.C., Courtneidge, S.A., and Magee, A.I. (1994). Palmitoylation of multiple Src-family kinases at a homologous N-terminal motif. *Biochem. J.* 303 (Pt 3, 749–753.

Komuro, A., Nagai, M., Navin, N.E., and Sudol, M. (2003). WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 33334–33341.

Konsavage, W.M., Kyler, S.L., Rennoll, S.A., Jin, G., and Yochum, G.S. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling Regulates Yes-associated Protein (YAP) Gene Expression in Colorectal Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 287, 11730–11739.

Kopetz, S., Desai, J., Chan, E., Hecht, J.R., O'Dwyer, P.J., Maru, D., Morris, V., Janku, F., Dasari, A., Chung, W., et al. (2015). Phase II Pilot Study of Vemurafenib in Patients With Metastatic BRAF-

Mutated Colorectal Cancer. *J. Clin. Oncol.* 33.

Kuipers, E.J., Grady, W.M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J.J., Boelens, P.G., van de Velde, C.J.H., and Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 1, 15065.

Kwon, Y., Vinayagam, A., Sun, X., Dephoure, N., Gygi, S.P., Hong, P., and Perrimon, N. (2013). The Hippo signaling pathway interactome. *Science* 342, 737–740.

L

Labbé, E., Lock, L., Letamendia, A., Gorska, A.E., Gryfe, R., Gallinger, S., Moses, H.L., and Attisano, L. (2007). Transcriptional cooperation between the transforming growth factor- β and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 67, 75–84.

Lai, D., Ho, K.C., Hao, Y., and Yang, X. (2011). Taxol resistance in breast cancer cells is mediated by the hippo pathway component TAZ and its downstream transcriptional targets Cyr61 and CTGF. *Cancer Res.* 71, 2728–2738.

Lamar, J.M., Stern, P., Liu, H., Schindler, J.W., Jiang, Z.-G., and Hynes, R.O. (2012). The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E2441-50.

LaQuaglia, M.J., Grijalva, J.L., Mueller, K.A., Perez-Atayde, A.R., Kim, H.B., Sadri-Vakili, G., and Vakili, K. (2016). YAP Subcellular Localization and Hippo Pathway Transcriptome Analysis in Pediatric Hepatocellular Carcinoma. *Sci. Rep.* 6, 30238.

Le, D.T., Uram, J.N., Wang, H., Bartlett, B.R., Kemberling, H., Eyring, A.D., Skora, A.D., Luber, B.S., Azad, N.S., Laheru, D., et al. (2015). PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* 372, 2509–2520.

Leconet, W., Larbouret, C., Chardès, T., Thomas, G., Neiveyans, M., Busson, M., Jarlier, M., Radošević-Robin, N., Pugnère, M., Bernex, F., et al. (2014). Preclinical validation of AXL receptor as a target for antibody-based pancreatic cancer immunotherapy. *Oncogene* 33, 5405–5414.

Lee, J.E., Park, H.S., Lee, D., Yoo, G., Kim, T., Jeon, H., Yeo, M.K., Lee, C.S., Moon, J.Y., Jung, S.S., et al. (2016). Hippo pathway effector YAP inhibition restores the sensitivity of EGFR-TKI in lung adenocarcinoma having primary or acquired EGFR-TKI resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 474, 154–160.

Lee, K.W., Lee, S.S., Kim, S.B., Sohn, B.H., Lee, H.S., Jang, H.J., Park, Y.Y., Kopetz, S., Kim, S.S., Oh, S.C., et al. (2015). Significant association of oncogene YAP1 with poor prognosis and cetuximab resistance in colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 21, 357–364.

Lehmann, W., Mossmann, D., Kleemann, J., Mock, K., Meisinger, C., Brummer, T., Herr, R., Brabletz, S., Stemmler, M.P., and Brabletz, T. (2016). ZEB1 turns into a transcriptional activator by interacting with YAP1 in aggressive cancer types. *Nat Commun* 7, 1–15.

Lei, Q.-Y., Zhang, H., Zhao, B., Zha, Z.-Y., Bai, F., Pei, X.-H., Zhao, S., Xiong, Y., and Guan, K.-L. (2008). TAZ promotes cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition and is inhibited by the hippo pathway. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2426–2436.

Leteurtre, E., Gouyer, V., Rousseau, K., Moreau, O., Barbat, A., Swallow, D., Huet, G., and Lesuffleur, T. (2004). Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biol. Cell* 96, 145–151.

- Levchenko, T., Bratt, A., Arbiser, J.L., and Holmgren, L. (2004). Angiomotin expression promotes hemangioendothelioma invasion. *Oncogene* 23, 1469–1473.
- Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N., and Shaul, Y. (2007). The Yes-associated protein 1 stabilizes p73 by preventing Itch-mediated ubiquitination of p73. *Cell Death Differ.* 14, 743–751.
- Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N., and Shaul, Y. (2008). Yap1 Phosphorylation by c-Abl Is a Critical Step in Selective Activation of Proapoptotic Genes in Response to DNA Damage. *Mol. Cell* 29, 350–361.
- Li, H., Wang, Z., Zhang, W., Qian, K., Liao, G., Xu, W., and Zhang, S. (2015a). VGLL4 inhibits EMT in part through suppressing Wnt/beta-catenin signaling pathway in gastric cancer. *Med. Oncol.* 32.
- Li, Y., Zhou, H., Li, F., Chan, S.W., Lin, Z., Wei, Z., Yang, Z., Guo, F., Lim, C.J., Xing, W., et al. (2015b). Angiomotin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Res.* 25, 801–817.
- Li, Z., Zhao, B., Wang, P., Chen, F., Dong, Z., and Yang, H. (2010). Structural insights into the YAP and TEAD complex service Structural insights into the YAP and TEAD complex. *Genes Dev.* 235–240.
- Lian, I., Kim, J., Okazawa, H., Zhao, J., Zhao, B., Yu, J., Chinnaiyan, A., Israel, M. a, Goldstein, L.S.B., Abujarour, R., et al. (2010). The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 24, 1106–1118.
- Liang, K., Zhou, G., Zhang, Q., Li, J., and Zhang, C. (2014a). Expression of hippo pathway in colorectal cancer. *Saudi J. Gastroenterol.* 20, 188–194.
- Liang, N., Zhang, C., Dill, P., Panasyuk, G., Pion, D., Koka, V., Gallazzini, M., Olson, E.N., Lam, H., Henske, E.P., et al. (2014b). Regulation of YAP by mTOR and autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex. *J. Exp. Med.* 211, 2249–2263.
- Liem T. Nguyen, Maria S. Tretiakova, Mark R. Silvis, Jared Lucas, Olga Klezovitch, Ilsa Coleman, Hamid Bolouri, Vassily I. Kutuyavin, Colm Morrissey, Lawrence D. True, and Peter S. Nelson, and V.V. (2015). ERG activates the YAP1 transcriptional program and induces the development of age-related prostate tumors. *Cancer Cell* 73, 389–400.
- Lievre, A., Bachet, J.-B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouche, O., Landi, B., Louvet, C., et al. (2008). KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 26, 374–379.
- Lièvre, A., Bachet, J.B., Le Corre, D., Boige, V., Landi, B., Emile, J.F., Côté, J.F., Tomasic, G., Penna, C., Ducreux, M., et al. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992–3995.
- Lin, L., Sabnis, A.J., Chan, E., Olivas, V., Cade, L., Pazarentzos, E., Asthana, S., Neel, D., Yan, J.J., Lu, X., et al. (2015). The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat. Genet.* 47, 250–256.
- Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S.W., Lim, C.J., Hong, W., et al. (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCFbeta-TrCP E3 ligase. *J. Biol. Chem.* 285, 37159–37169.
- Liu, J.-Y., Li, Y.-H., Lin, H.-X., Liao, Y.-J., Mai, S.-J., Liu, Z.-W., Zhang, Z.-L., Jiang, L.-J., Zhang,

J.-X., Kung, H.-F., et al. (2013). Overexpression of YAP 1 contributes to progressive features and poor prognosis of human urothelial carcinoma of the bladder. *BMC Cancer* 13, 349.

Liu, Y., Wang, G., Yang, Y., Mei, Z., Liang, Z., Cui, a, Wu, T., Liu, C.-Y., and Cui, L. (2015). Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner. *Oncogene* 1–12.

Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J.S., Chen, Q., Lee, S.-J., Anders, R. a, Liu, J.O., and Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev.* 26, 1300–1305.

Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Action and Clinical Strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338.

Lv, M., Li, S., Luo, C., Zhang, X., and Shen, Y. (2014). Angiomotin promotes renal epithelial and carcinoma cell proliferation by retaining the nuclear YAP. *Oncotarget* 1.

Lv, X.-B., Liu, C.-Y., Wang, Z., Sun, Y.-P., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., and Guan, K.-L. (2015). PARD3 induces TAZ activation and cell growth by promoting LATS1 and PP1 interaction. *EMBO Rep.* 16, e201439951.

M

Makita, R., Uchijima, Y., Nishiyama, K., Amano, T., Chen, Q., Takeuchi, T., Mitani, A., Nagase, T., Yatomi, Y., Aburatani, H., et al. (2008). Multiple renal cysts , urinary concentration defects , and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 542–553.

Mao, B., Hu, F., Cheng, J., Wang, P., Xu, M., Yuan, F., Meng, S., Wang, Y., Yuan, Z., and Bi, W. (2014). SIRT1 regulates YAP2-mediated cell proliferation and chemoresistance in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 33, 1468–1474.

Marcato, P., Dean, C.A., Giacomantonio, C.A., and Lee, P.W.K. (2011). Aldehyde dehydrogenase its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* 10, 1378–1384.

Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M.P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M.-C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., et al. (2013). Gene expression classification of colon cancer into molecular subtypes: characterization, validation, and prognostic value. *PLoS Med.* 10, e1001453.

Matsuoka, S., Huang, M., and Elledge, S.J. (1998). Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282, 1893–1897.

Mauviel, a, Nallet-Staub, F., and Varelas, X. (2012). Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene* 31, 1743–1756.

Meserve, J.H., and Duronio, R.J. (2015). Scalloped and Yorkie are required for cell cycle re-entry of quiescent cells after tissue damage. *Development* 2740–2751.

Minoo, P., Zlobec, I., Baker, K., Tornillo, L., Terracciano, L., Jass, J.R., and Lugli, A. (2007). Prognostic significance of mammalian sterile20-like kinase 1 in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* 20, 331–338.

Mo, J., Meng, Z., Kim, Y.C., Park, H.W., Hansen, C.G., and Kim, S. (2015). Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat. Cell Biol.* 17, 500–510.

Moleirinho, S., Guerrant, W., and Kissil, J.L. (2014). The Angiomotins - From discovery to function.

FEBS Lett. 588, 2693–2703.

Monnier, Y., Farmer, P., Bieler, G., Imaizumi, N., Sengstag, T., Alghisi, G.C., Stehle, J.C., Ciarloni, L., Andrejevic-Blant, S., Moeckli, R., et al. (2008). CYR61 and $\alpha V\beta 5$ integrin cooperate to promote invasion and metastasis of tumors growing in preirradiated stroma. *Cancer Res.* 68, 7323–7331.

Morin-kensicki, E.M., Boone, B.N., Howell, M., Stonebraker, J.R., Teed, J., Alb, J.G., Magnuson, T.R., Neal, W.O., Milgram, S.L., Carolina, N., et al. (2006). Defects in Yolk Sac Vasculogenesis, Chorioallantoic Fusion, and Embryonic Axis Elongation in Mice with Targeted Disruption of Yap65. *Mol. Cell. Biol.* 26, 77–87.

Mulvihill, M.M., Benjamin, D.I., Ji, X., Le Scolan, E., Louie, S.M., Shieh, A., Green, M., Narasimhalu, T., Morris, P.J., Luo, K., et al. (2014). Metabolic profiling reveals PAFAH1B3 as a critical driver of breast cancer pathogenicity. *Chem. Biol.* 21, 831–840.

Muramatsu, T., Imoto, I., Matsui, T., Kozaki, K.I., Haruki, S., Sudol, M., Shimada, Y., Tsuda, H., Kawano, T., and Inazawa, J. (2011). YAP is a candidate oncogene for esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 32, 389–398.

N

Nagaraj, R., Gururaja-Rao, S., Jones, K.T., Slattery, M., Negre, N., Braas, D., Christofk, H., White, K.P., Mann, R., and Banerjee, U. (2012). Control of mitochondrial structure and function by the Yorkie/YAP oncogenic pathway. *Genes Dev.* 26, 2027–2037.

Network, T.C.G.A. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487, 330–337.

Noguchi, S., Saito, A., Horie, M., Mikami, Y., Suzuki, H.I., Morishita, Y., Ohshima, M., Abiko, Y., Mattsson, J.S. ofia M., König, H., et al. (2014). An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 20, 4660–4672.

Nordlinger, B., Sorbye, H., Glimelius, B., Poston, G.J., Schlag, P.M., Rougier, P., Bechstein, W.O., Primrose, J.N., Walpole, E.T., Finch-Jones, M., et al. (2008). Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet* 371, 1007–1016.

Nordlinger, B., Sorbye, H., Glimelius, B., Poston, G.J., Schlag, P.M., Rougier, P., Bechstein, W.O., Primrose, J.N., Walpole, E.T., Finch-Jones, M., et al. (2013). Perioperative FOLFOX4 chemotherapy and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC 40983): Long-term results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 14, 1208–1215.

O

Oka, T., Mazack, V., and Sudol, M. (2008). Mst2 and Lats kinases regulate apoptotic function of Yes kinase-associated protein (YAP). *J. Biol. Chem.* 283, 27534–27546.

Oku, Y., Nishiya, N., Shito, T., Yamamoto, R., Yamamoto, Y., Oyama, C., and Uehara, Y. (2015). Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers. *FEBS Open Bio* 5, 542–549.

Oudhoff, M.J., Freeman, S.A., Couzens, A.L., Antignano, F., Kuznetsova, E., Min, P.H., Northrop, J.P., Lehnertz, B., Barsyte-Lovejoy, D., Vedadi, M., et al. (2013). Control of the Hippo Pathway by Set7-Dependent Methylation of Yap. *Dev. Cell* 26, 188–194.

Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G.A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D.C., Deng, C.-X., Brugge, J.S., and Haber, D.A. (2006). Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12405–12410.

P

Park, Y.Y., Sohn, B.H., Johnson, R.L., Kang, M.H., Kim, S.B., Shim, J.J., Mangala, L.S., Kim, J.H., Yoo, J.E., Rodriguez-Aguayo, C., et al. (2016). Yes-associated protein 1 and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif activate the mammalian target of rapamycin complex 1 pathway by regulating amino acid transporters in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *63*, 159–172.

Pefani, D.-E., Pankova, D., Abraham, A.G., Grawenda, A.M., Vlahov, N., Scrace, S., and O' Neill, E. (2016). TGF- β Targets the Hippo Pathway Scaffold RASSF1A to Facilitate YAP/SMAD2 Nuclear Translocation. *Mol. Cell* *156*–166.

Phelip JM, Bouché O, Conroy T, Michel P, Penna C, Tournigand C, Louvet C, B.L. (2014). Cancer colorectal métastatique. 4ème version “Cancer Color. métastatique” Thésaurus Natl. Chir. Dig.

Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* *94*, 1287–1312.

Pobbati, A. V., Chan, S.W., Lee, I., Song, H., and Hong, W. (2012). Structural and functional similarity between the Vgll1-TEAD and the YAP-TEAD complexes. *Structure* *20*, 1135–1140.

Pobbati, A. V., Han, X., Hung, A.W., Weiguang, S., Huda, N., Chen, G.Y., Kang, C., Chia, C.S.B., Luo, X., Hong, W., et al. (2015). Targeting the Central Pocket in Human Transcription Factor TEAD as a Potential Cancer Therapeutic Strategy. *Structure* *23*, 2076–2086.

Popat, S., Hubner, R., and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J. Clin. Oncol.* *23*, 609–618.

Q

Qi, Y., Yu, J., Han, W., Fan, X., Qian, H., Wei, H., Tsai, Y.S., Zhao, J., Zhang, W., Liu, Q., et al. (2016). A splicing isoform of TEAD4 attenuates the Hippo–YAP signalling to inhibit tumour proliferation. *Nat. Commun.* *7*, 1–12.

R

Reuven, N., Adler, J., Meltser, V., and Shaul, Y. (2013). The Hippo pathway kinase Lats2 prevents DNA damage-induced apoptosis through inhibition of the tyrosine kinase c-Abl. *Cell Death Differ.* *20*, 1330–1340.

Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105–111.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Nervous System Generation of Neurons and Astrocytes from Isolated Cells of the Adult Mammalian Central Nervous System. *Science* (80-.). *255*, 1707–1710.

Roepman, P., Schlicker, A., Taberner, J., Majewski, I., Tian, S., Moreno, V., Snel, M.H., Chresta, C.M., Rosenberg, R., Nitsche, U., et al. (2014). Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition. *Int. J. Cancer* *134*, 552–562.

De Roock, W., Claes, B., Bernasconi, D., De Schutter, J., Biesmans, B., Fountzilias, G., Kalogeras, K.T., Kotoula, V., Papamichael, D., Laurent-Puig, P., et al. (2010). Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: A retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* *11*, 753–762.

Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A.G., Li, X., Neal, J.T., Schafer, E.J., Zack, T.I., Wang, X., Tsherniak, A., Schinzel, A.C., et al. (2012). β -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* *151*, 1457–1473.

Royer, C., Koch, S., Qin, X., Zak, J., Buti, L., Dudzic, E., Zhong, S., Ratnayaka, I., Srinivas, S., and Lu, X. (2014). ASPP2 links the apical lateral polarity complex to the regulation of YAP activity in epithelial cells. *PLoS One* *9*, 14–17.

S

Sadanandam, A., Lyssiotis, C.A., Homicsko, K., and Eric, A. (2013). A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy. *Nat. Med.* *19*, 619–625.

Sancier, F., Dumont, A., Sirvent, A., Paquay de Plater, L., Edmonds, T., David, G., Jan, M., de Montrion, C., Cogé, F., Léonce, S., et al. (2011). Specific oncogenic activity of the Src-family tyrosine kinase c-Yes in colon carcinoma cells. *PLoS One* *6*, e17237.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* *459*, 262–265.

Sawada, A., Kiyonari, H., Ukita, K., Nishioka, N., Imuta, Y., and Sasaki, H. (2008). Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 3177–3189.

Scheithauer, W., Rosen, H., Kornek, G., Sebesta, C., and Depisch, D. (1993). Randomised comparison of combination chemotherapy plus supportive care with supportive care alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. Med. J.* *306*, 752–755.

Schlicker, A., Beran, G., Chresta, C.M., McWalter, G., Pritchard, A., Weston, S., Runswick, S., Davenport, S., Heathcote, K., Castro, D.A., et al. (2012). Subtypes of primary colorectal tumors correlate with response to targeted treatment in colorectal cell lines. *BMC Med. Genomics* *5*, 66.

Sebio A and Lenz H-J (2015). Molecular Pathways: Hippo Signaling, a Critical Tumor Suppressor. *Clin. Cancer Res.*

Seo, E., Basu-Roy, U., Gunaratne, P.H., Coarfa, C., Lim, D.S., Basilico, C., and Mansukhani, A. (2013). SOX2 Regulates YAP1 to Maintain Stemness and Determine Cell Fate in the Osteo-Adipo Lineage. *Cell Rep.* *3*, 2075–2087.

Shen, S., Guo, X., Yan, H., Lu, Y., Ji, X., Li, L., Liang, T., Zhou, D., Feng, X.-H., Zhao, J.C., et al. (2015). A miR-130a-YAP positive feedback loop promotes organ size and tumorigenesis. *Cell Res.* *25*, 997–1012.

Sikandar, S.S., Pate, K.T., Anderson, S., Dizon, D., Edwards, R. a, Waterman, M.L., and Lipkin, S.M. (2010). NOTCH signaling is required for formation and self-renewal of tumor-initiating cells and for repression of secretory cell differentiation in colon cancer. *Cancer Res.* *70*, 1469–1478.

Singh, S., Arcaroli, J., Messersmith, W., and Vasiliou, V. (2015). Acetaldehyde and Retinaldehyde-

Metabolizing Enzymes in Colon and Pancreatic cancers. *Adv Exp Med Biol* 815, 281–294.

Song, M., Cheong, J.H., Kim, H., Noh, S.H., and Kim, H. (2012). Nuclear expression of Yes-associated protein 1 correlates with poor prognosis in intestinal type gastric cancer. *Anticancer Res.* 32, 3827–3834.

Song, S., Ajani, J.A., Honjo, S., Maru, D.M., Chen, Q., Scott, A.W., Heallen, T.R., Xiao, L., Hofstetter, W.L., Weston, B., et al. (2014). Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows esophageal Cancer cells with stem-like properties. *Cancer Res.* 74, 4170–4182.

Song, S., Honjo, S., Jin, J., Chang, S.S., Scott, A.W., Chen, Q., Kalhor, N., Correa, A.M., Hofstetter, W.L., Albarracin, C.T., et al. (2015). The hippo coactivator YAP1 mediates EGFR overexpression and confers chemoresistance in esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.* 21, 2580–2590.

Sorrentino, G., Ruggeri, N., Specchia, V., Cordenonsi, M., Mano, M., Dupont, S., Manfrin, A., Ingallina, E., Sommaggio, R., Piazza, S., et al. (2014). Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat. Cell Biol.* 16, 357–366.

Stangl, R., Altendorf-Hofmann, A., Charnley, R.M., and Scheele, J. (1994). Factors influencing the natural history of colorectal liver metastases. *Lancet* 343, 1405–1410.

Steinhardt A.A, Gayyed M.F, K.A.. et al. (2009). Expression of Yes-Associated Protein, YAP, in Common Solid Tumors. *Hum. Pathol.* 39, 1582–1589.

Steven, a., Heiduk, M., Recktenwald, C. V., Hiebl, B., Wickenhauser, C., Massa, C., and Seliger, B. (2015). Colorectal Carcinogenesis: Connecting K-RAS-Induced Transformation and CREB Activity In Vitro and In Vivo. *Mol. Cancer Res.* 13, 1248–1262.

Strano, S., Monti, O., Pediconi, N., Baccharini, A., Fontemaggi, G., Lapi, E., Mantovani, F., Damalas, A., Citro, G., Sacchi, A., et al. (2005). The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage. *Mol. Cell* 18, 447–459.

Striedinger, K., VandenBerg, S.R., Baia, G.S., McDermott, M.W., Gutmann, D.H., and Lal, A. (2008). The neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, regulates human meningioma cell growth by signaling through YAP. *Neoplasia* 10, 1204–1212.

Sudol, M. (1995). Characterization of the Mammalian YAP (Yes-associated Protein) Gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J. Biol. Chem.*

Swamy, M. V., Patlolla, J.M.R., Steele, V.E., Kopelovich, L., Reddy, B.S., and Rao, C. V. (2006). Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by low doses of atorvastatin and celecoxib given individually and in combination to APC Min mice. *Cancer Res.* 66, 7370–7377.

T

Tabernero, J., Yoshino, T., Cohn, A.L., Obermannova, R., Bodoky, G., Garcia-Carbonero, R., Ciuleanu, T.E., Portnoy, D.C., Van Cutsem, E., Grothey, A., et al. (2015). Ramucicrumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): A randomised, double-blind. *Lancet Oncol.* 16, 499–508.

Taccioli, C., Sorrentino, G., Zannini, A., Caroli, J., Beneventano, D., Anderlucchi, L., Lolli, M., Biccato, S., and Del Sal, G. (2015). MDP, a database linking drug response data to genomic information, identifies dasatinib and statins as a combinatorial strategy to inhibit YAP/TAZ in cancer

cells. *Oncotarget* 6, 38854–38865.

Tajima, A., Hess, M.T., Cabrera, B.L., Kolodner, R.D., and Carethers, J.M. (2004). The mismatch repair complex hMutSalph α recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: Implications for chemosensitivity and resistance. *Gastroenterology* 127, 1678–1684.

Takahashi, Y., Miyoshi, Y., Takahata, C., Irahara, N., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2005). Down-regulation of LATS1 and LATS2 mRNA expression by promoter hypermethylation and its association with biologically aggressive phenotype in human breast cancers. *Clin. Cancer Res.* 11, 1380–1385.

Takeishi, S., Matsumoto, A., Onoyama, I., Naka, K., Hirao, A., and Nakayama, K.I. (2013). Ablation of Fbxw7 Eliminates Leukemia-Initiating Cells by Preventing Quiescence. *Cancer Cell* 23, 347–361.

Tamaoki, Y., Beppu, T., Sakamoto, Y., Imai, K., Hayashi, H., Nitta, H., Hashimoto, D., Miyamoto, Y., Tsuruta, Y., Chikamoto, A., et al. (2015). A 5-year recurrence-free survivor with over ten colorectal liver metastases undergoing FOLFOX plus bevacizumab followed by two-stage hepatectomy. *Surg. Case Reports* 1, 111.

Tamm, C., Böwer, N., and Annerén, C. (2011). Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. *J. Cell Sci.* 124, 1136–1144.

Tan, G., Cao, X., Dai, Q., Zhang, B., Huang, J., Xiong, S., Zhang, Y.Y., Chen, W., Yang, J., and Li, H. (2015). A novel role for microRNA-129-5p in inhibiting ovarian cancer cell proliferation and survival via direct suppression of transcriptional co-activators YAP and TAZ. *Oncotarget* 6, 8676–8686.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., and Ferlay, J. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA. Cancer J. Clin.* 65, 87–108.

Tschaharganeh, D.F., Chen, X., Latzko, P., Malz, M., Gaida, M.M., Felix, K., Ladu, S., Singer, S., Pinna, F., Gretz, N., et al. (2013). Yes-associated protein up-regulates Jagged-1 and activates the Notch pathway in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 144, 1530–1542.e12.

Tu, K., Yang, W., Li, C., Zheng, X., Lu, Z., Guo, C., Yao, Y., and Liu, Q. (2014). Fbxw7 is an independent prognostic marker and induces apoptosis and growth arrest by regulating YAP abundance in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer* 13, 110.

V

Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B.M., Dembowy, J., Yaffe, M.B., Zandstra, P.W., and Wrana, J.L. (2008). TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 10, 837–848.

Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., and Wrana, J.L. (2010). The Crumbs Complex Couples Cell Density Sensing to Hippo-Dependent Control of the TGF-beta-SMAD Pathway. *Dev. Cell* 19, 831–844.

Vassilev, a, Kaneko, K.J., Shu, H., Zhao, Y., and DePamphilis, M.L. (2001). TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* 15, 1229–1241.

Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M.R., Kemper, K., Perez Alea, M., Richel, D.J., Stassi, G., and Medema, J.P. (2008). Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13427–13432.

W

- Wang, D., Fu, L., Sun, H., Guo, L., and Dubois, R.N. (2015a). Prostaglandin E2 Promotes Colorectal Cancer Stem Cell Expansion and Metastasis in Mice. *Gastroenterology* *149*, 1884–1895e4.
- Wang, J., Ma, L., Weng, W., Qiao, Y., Zhang, Y., He, J., Wang, H., Xiao, W., Li, L., Chu, Q., et al. (2013a). Mutual interaction between YAP and CREB promotes tumorigenesis in liver cancer. *Hepatology* *58*, 1011–1020.
- Wang, L., Shi, S., Guo, Z., Zhang, X., Han, S., Yang, A., Wen, W., and Zhu, Q. (2013b). Overexpression of YAP and TAZ Is an Independent Predictor of Prognosis in Colorectal Cancer and Related to the Proliferation and Metastasis of Colon Cancer Cells. *PLoS One* *8*.
- Wang, T.-L., Diaz, L.A., Romans, K., Bardelli, A., Saha, S., Galizia, G., Choti, M., Donehower, R., Parmigiani, G., Shih, I.-M., et al. (2004). Digital karyotyping identifies thymidylate synthase amplification as a mechanism of resistance to 5-fluorouracil in metastatic colorectal cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3089–3094.
- Wang, W., Marsh, S., Cassidy, J., and McLeod, H.L. (2001). Pharmacogenomic dissection of resistance to thymidylate synthase inhibitors. *Cancer Res.* *61*, 5505–5510.
- Wang, W., Li, X., Huang, J., Feng, L., Dolinta, K.G., and Chen, J. (2014a). Defining the protein-protein interaction network of the human hippo pathway. *Mol. Cell. Proteomics* *13*, 119–131.
- Wang, X., Ren, Y., Zhuang, H., Meng, X., Huang, S., Li, Y., Hehir, M., and Wang, P. (2015b). Decrease of phosphorylated proto-oncogene CREB at Ser 133 site inhibits growth and metastatic activity of renal cell cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* *19*, 985–995.
- Wang, Z., Wu, Y., Wang, H., Zhang, Y., Mei, L., Fang, X., Zhang, X., Zhang, F., Chen, H., Liu, Y., et al. (2014b). Interplay of mevalonate and Hippo pathways regulates RHAMM transcription via YAP to modulate breast cancer cell motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, E89-98.
- Watson, R.G., Muhale, F., Thorne, L.B., Yu, J., O’Neil, B.H., Hoskins, J.M., Meyers, M.O., Deal, A.M., Ibrahim, J.G., Hudson, M.L., et al. (2010). Amplification of thymidylate synthetase in metastatic colorectal cancer patients pretreated with 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Eur. J. Cancer* *46*, 3358–3364.
- Wichert, D. a, de Haas, R.J., Salloum, C., Andreani, P., Pascal, G., Sotirov, D., Adam, R., Castaing, D., and Azoulay, D. (2013). Repeat hepatectomy for recurrent colorectal metastases. *Br. J. Surg.* *100*, 808–818.
- Wierzbicki, P.M., Adrych, K., Kartanowicz, D., Stanislawowski, M., Kowalczyk, A., Godlewski, J., Skwierz-Bogdanska, I., Celinski, K., Gach, T., Kulig, J., et al. (2013). Underexpression of LATS1 TSG in colorectal cancer is associated with promoter hypermethylation. *World J. Gastroenterol.* *19*, 4363–4373.
- Wilkinson, D.S., Jariwala, J.S., Anderson, E., Mitra, K., Meisenhelder, J., Chang, J.T., Ideker, T., Hunter, T., Nizet, V., and Dillin, A. (2016). Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy. *Mol. Cell* *57*, 55–68.
- Wilson, B.J., Schatton, T., Zhan, Q., Gasser, M., Jie, M., Saab, K.R., Schanche, R., Waaga-Gasser, A.M., Gold, J.S., Huang, Q., et al. (2011). ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* *71*, 5307–5316.

Wu, S., Huang, J., Dong, J., and Pan, D. (2003). hippo Encodes a Ste-20 Family Protein Kinase that Restricts Cell Proliferation and Promotes Apoptosis in Conjunction with salvador and warts. *Cell* *114*, 445–456.

Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J., and Pan, D. (2008). The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev. Cell* *14*, 388–398.

X

Xia, Y., Zhang, Y.L., Yu, C., Chang, T., and Fan, H.Y. (2014). YAP/TEAD Co-Activator regulated pluripotency and chemoresistance in ovarian cancer Initiated Cells. *PLoS One* *9*.

Xiang, L., Gilkes, D.M., Hu, H., Takano, N., Luo, W., Lu, H., Bullen, J.W., Samanta, D., Liang, H., and Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 mediates TAZ expression and nuclear localization to induce the breast cancer stem cell phenotype. *Oncotarget* *5*, 12509–12527.

Xie, D., Cui, J., Xia, T., Jia, Z., Wang, L., and Wei, W. (2015). Hippo transducer TAZ promotes epithelial mesenchymal transition and supports pancreatic cancer progression. *Oncotarget*.

Xu, M.Z., Yao, T., Lee, N.P.Y., Ng, I.O.L., Chan, Y., Zender, L., Lowe, S.W., Poon, R.T.P., and Luk, J.M. (2009). Yes-Associated Protein Is an Independent Prognostic Marker in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer* *115*, 4576–4585.

Y

Yagi, R., Chen, L.F., Shigesada, K., Murakami, Y., and Ito, Y. (1999). A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J.* *18*, 2551–2562.

Ye, L.C., Liu, T.S., Ren, L., Wei, Y., Zhu, D.X., Zai, S.Y., Ye, Q.H., Yu, Y., Xu, B., Qin, X.Y., et al. (2013). Randomized controlled trial of cetuximab plus chemotherapy for patients with KRAS wild-type unresectable colorectal liver-limited metastases. *J. Clin. Oncol.* *31*, 1931–1938.

Yi, T., Zhai, B., Yu, Y., Kiyotsugu, Y., Raschle, T., Eitzkorn, M., Seo, H.-C., Nagiec, M., Luna, R.E., Reinherz, E.L., et al. (2014). Quantitative phosphoproteomic analysis reveals system-wide signaling pathways downstream of SDF-1/CXCR4 in breast cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E2182-90.

Yigitler, C., Farges, O., Kianmanesh, R., Regimbeau, J.M., Abdalla, E.K., and Belghiti, J. (2003). The small remnant liver after major liver resection: How common and how relevant? *Liver Transplant.* *9*.
Yimlamai, D., Christodoulou, C., Galli, G.G., Yanger, K., Pepe-Mooney, B., Gurung, B., Shrestha, K., Cahan, P., Stanger, B.Z., and Camargo, F.D. (2014). Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* *157*, 1324–1338.

Yu, F., Zhang, Y., Park, H.W., Yu, F., Zhang, Y., Park, H.W., Jewell, J.L., Chen, Q., and Deng, Y. (2013). proliferation and differentiation Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. 1223–1232.

Yu, F.X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., et al. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* *150*, 780–791.

Yu, F.-X., Luo, J., Mo, J.-S., Liu, G., Kim, Y.C., Meng, Z., Zhao, L., Peyman, G., Ouyang, H., Jiang, W., et al. (2014). Mutant Gq/11 Promote Uveal Melanoma Tumorigenesis by Activating YAP. *Cancer Cell* *25*, 822–830.

Yuen, H.-F., McCrudden, C.M., Huang, Y.-H., Tham, J.M., Zhang, X., Zeng, Q., Zhang, S.-D., and Hong, W. (2013). TAZ expression as a prognostic indicator in colorectal cancer. *PLoS One* 8, e54211.

Z

Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.* 17, 1218–1227.

Zanconato, F., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2016). YAP / TAZ at the roots of cancer. *Cancer Cell* 29, 783–803.

Zender, L., Spector, M.S., Xue, W., Flemming, P., Cordon-Cardo, C., Silke, J., Fan, S.T., Luk, J.M., Wigler, M., Hannon, G.J., et al. (2006). Identification and Validation of Oncogenes in Liver Cancer Using an Integrative Oncogenomic Approach. *Cell* 125, 1253–1267.

Zhang, H., Ramakrishnan, S.K., Triner, D., Centofanti, B., Maitra, D., Győrffy, B., Sebolt-Leopold, J.S., Dame, M.K., Varani, J., Brenner, D.E., et al. (2015). Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1. *Sci. Signal.* 8, ra98.

Zhang, T., Zhang, J., You, X., Liu, Q., Du, Y., Gao, Y., Shan, C., Kong, G., Wang, Y., Yang, X., et al. (2012). Hepatitis B virus X protein modulates oncogene yes-associated protein by CREB to promote growth of hepatoma cells. *Hepatology* 56, 2051–2059.

Zhang, W., Gao, Y., Li, P., Shi, Z., Guo, T., Li, F., Han, X., Feng, Y., Zheng, C., Wang, Z., et al. (2014). VGLL4 functions as a new tumor suppressor in lung cancer by negatively regulating the YAP-TEAD transcriptional complex. *Cell Res.* 24, 331–343.

Zhang, X., George, J., Deb, S., Degoutin, J.L., Takano, E.A., Fox, S.B., Bowtell, D.D.L., and Harvey, K.F. (2011). The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, is an ovarian cancer oncogene. *Oncogene* 30, 2810–2822.

Zhao, B., and Li, L. (2010). Hippo signaling at a glance Hippo Signaling at a Glance. *J. Cell Sci.* 123, 4001–4006.

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

Zhao, B., Li, L., Lei, Q., and Guan, K. (2010a). The Hippo – YAP pathway in organ size control and tumorigenesis : an updated version. 862–874.

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., and Guan, K.L. (2010b). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF β -TRCP. *Genes Dev.* 24, 72–85.

Zhao, B., Li, L., Lu, Q., Wang, L.H., Liu, C.Y., Lei, Q., and Guan, K.L. (2011). Angiotensin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* 25, 51–63.

Zhou, D., Conrad, C., Xia, F., Park, J.-S., Payer, B., Yin, Y., Lauwers, G.Y., Thasler, W., Lee, J.T., Avruch, J., et al. (2009). Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell* 16, 425–438.

Zhou, D., Zhang, Y., Wu, H., Barry, E., Yin, Y., Lawrence, E., and Dawson, D. (2011). Mst1 and Mst2 protein kinases restrain intestinal stem cell proliferation and colonic tumorigenesis by inhibition

of Yes-associated protein (Yap) overabundance.

Annexes

Annexes 1 et 2 : Tableaux des analyses transcriptomiques sur cellules 5F7 et 5F31 transfectées avec le YAP^{S127A}

Annexe n°1 Analyse transcriptomique des 5F31 Ctrl vs 5F31 YAPdc

N° Sonde	Nom du gène	Description	Fold Change
A_24_P344961	AMOT	angiotensin (AMOT), transcript variant 2, mRNA [NM_133265]	53,5
A_23_P70307	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2 (SMOC2), transcript variant 1, mRNA [NM_022138]	25,0
A_33_P3338733	MITF	microphthalmia-associated transcription factor (MITF), transcript variant 1, mRNA [NM_198159]	22,3
A_23_P501933	CACNG6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6 (CACNG6), transcript variant 1, mRNA [NM_145814]	16,1
A_33_P3347397	AMOT	angiotensin (AMOT), transcript variant 1, mRNA [NM_001113490]	13,9
A_23_P143713	APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G), mRNA [NM_021822]	13,8
A_23_P82503	PEG10	paternally expressed 10 (PEG10), transcript variant 1, mRNA [NM_001040152]	13,6
A_23_P353035	IGFBP7	insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7), mRNA [NM_001553]	12,7
A_33_P3351416	SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2 (SMOC2), transcript variant 1, mRNA [NM_022138]	12,2
A_23_P426663	MITF	microphthalmia-associated transcription factor (MITF), transcript variant 1, mRNA [NM_198159]	11,9
A_32_P437004	XG	Xg blood group (XG), transcript variant 1, mRNA [NM_175569]	11,6
A_23_P120931	APOBEC3C	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C (APOBEC3C), mRNA [NM_014508]	11,3
A_23_P161218	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) (ANKRD1), mRNA [NM_014391]	10,8
A_23_P108673	FAM176A	family with sequence similarity 176, member A (FAM176A), transcript variant 2, mRNA [NM_032181]	10,7
A_24_P286114	SLC1A3	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 (SLC1A3), transcript variant 1, mRNA [NM_004172]	10,0
A_23_P119916	WNT6	wingless-type MMTV integration site family, member 6 (WNT6), mRNA [NM_006522]	9,9
A_33_P3413821	KIRREL	cDNA FLJ33235 fis, clone ASTRO2002202. [AK090554]	9,8
A_23_P357101	APOBEC3F	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F (APOBEC3F), transcript variant 1, mRNA [NM_145298]	9,7
A_23_P104762	YAP1	Yes-associated protein 1 (YAP1), transcript variant 2, mRNA [NM_006106]	9,6
A_24_P319923	MYLK	myosin light chain kinase (MYLK), transcript variant 1, mRNA [NM_053025]	9,5
A_24_P365349	CACNG7	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 7 (CACNG7), mRNA [NM_031896]	8,8
A_24_P314337	PAGE1	P antigen family, member 1 (prostate associated) (PAGE1), mRNA [NM_003785]	8,7
A_24_P110983	AKT3	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3 (protein kinase B, gamma) (AKT3), transcript variant 1, mRNA [NM_005465]	8,4
A_33_P3222109	XG	Xg blood group (XG), transcript variant 2, mRNA [NM_001141919]	8,2
A_32_P86739	C10orf114	chromosome 10 open reading frame 114 (C10orf114), mRNA [NM_001010911]	7,8
A_33_P3262181	APOBEC3F	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F (APOBEC3F), transcript variant 2, mRNA [NM_001006666]	7,8
A_23_P96291	MAGEA1	melanoma antigen family A, 1 (directs expression of antigen MZ2-E) (MAGEA1), mRNA [NM_004988]	7,7
A_23_P27584	MYADM	myeloid-associated differentiation marker (MYADM), transcript variant 1, mRNA [NM_001020818]	7,7

A_23_P143817	MYLK	myosin light chain kinase (MYLK), transcript variant 1, mRNA [NM_053025]	7,7
A_23_P29769	WWTR1	WW domain containing transcription regulator 1 (WWTR1), transcript variant 1, mRNA [NM_015472]	7,6
A_23_P215111	ATP6V0A4	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a4 (ATP6V0A4), transcript variant 1, mRNA [NM_020632]	7,5
A_33_P3342375	MAGEA6	melanoma antigen family A, 6 (MAGEA6), transcript variant 2, mRNA [NM_175868]	7,5
A_23_P208389	AXL	AXL receptor tyrosine kinase (AXL), transcript variant 1, mRNA [NM_021913]	7,3
A_23_P26124	RORA	RAR-related orphan receptor A (RORA), transcript variant 2, mRNA [NM_134260]	7,2
A_23_P411851	C14orf49	chromosome 14 open reading frame 49 (C14orf49), mRNA [NM_152592]	7,2
A_33_P3229617	SGCE	sarcoglycan, epsilon (SGCE), transcript variant 1, mRNA [NM_001099401]	6,8
A_23_P209360	KLHL29	kelch-like 29 (Drosophila) (KLHL29), mRNA [NM_052920]	6,7
A_32_P46214	SLC9A9	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9 (SLC9A9), mRNA [NM_173653]	6,7
A_23_P85240	TLR7	toll-like receptor 7 (TLR7), mRNA [NM_016562]	6,6
A_33_P3353027	CHN2	chimerin (chimaerin) 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:1944] [ENST00000461824]	6,4
A_24_P197537	PDE8B	phosphodiesterase 8B (PDE8B), transcript variant 1, mRNA [NM_003719]	6,4
A_33_P3285299	GPRIN2	G protein regulated inducer of neurite outgrowth 2 (GPRIN2), mRNA [NM_014696]	6,2
A_33_P3248439	FAM125B	family with sequence similarity 125, member B (FAM125B), transcript variant 1, mRNA [NM_033446]	6,0
A_23_P148255	MAGEA2B	melanoma antigen family A, 2B (MAGEA2B), mRNA [NM_153488]	6,0
A_24_P185945	MAGEA4	melanoma antigen family A, 4 (MAGEA4), transcript variant 2, mRNA [NM_002362]	5,9
A_23_P100711	PMP22	peripheral myelin protein 22 (PMP22), transcript variant 1, mRNA [NM_000304]	5,8
A_23_P136870	MAGEA6	melanoma antigen family A, 6 (MAGEA6), transcript variant 2, mRNA [NM_175868]	5,8
A_24_P567298	CSAG2	CSAG family, member 2 (CSAG2), transcript variant 2, mRNA [NM_004909]	5,7
A_23_P46429	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (CYR61), mRNA [NM_001554]	5,6

Annexe n°1. Les 50 transcrits les plus augmentées dans les 5F31 YAPdc par rapport aux 5F31 Ctrl. Sont représentés ici les transcrits dont l'augmentation est la plus importante suite à la transfection par le YAP^{S127A}. Les transcrits surlignés en jaune et en vert sont les transcrits décrits comme interagissant avec la voie Hippo ou ses effecteurs ; le vert désigne les transcrits communément retrouvés avec les cellules 5F7 surexprimant le YAP^{S127A}. Les transcrits en rouge sont des transcrits communément retrouvés entre les 5F31 YAP^{S127A} et 5F7 YAP^{S127A} n'ayant pas de lien décrits avec la voie Hippo.

Annexe n°2 Analyse transcriptomique des 5F7 Ctrl vs 5F7 YAPdc

N° Sonde	Nom du gène	Description	Fold Change
A_23_P161218	ANKRD1	Homo sapiens ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle) (ANKRD1), mRNA [NM_014391]	67,4
A_23_P216712	TRPM6	Homo sapiens transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6 (TRPM6), transcript variant a, mRNA [NM_017662]	45,0
A_33_P3267577	SEMG1	Homo sapiens semenogelin I (SEMG1), mRNA [NM_003007]	27,6
A_23_P312358	BEND7	Homo sapiens BEN domain containing 7 (BEND7), transcript variant 1, mRNA [NM_152751]	25,3
A_23_P518	VTCN1	Homo sapiens V-set domain containing T cell activation inhibitor 1 (VTCN1), mRNA [NM_024626]	25,2
A_32_P200238	UCA1	Homo sapiens urothelial cancer associated 1 (non-protein coding) (UCA1), non-coding RNA [NR_015379]	23,3
A_24_P272313	C2orf55	Homo sapiens chromosome 2 open reading frame 55 (C2orf55), mRNA [NM_207362]	22,9
A_23_P214267	GPR110	Homo sapiens G protein-coupled receptor 110 (GPR110), transcript variant 1, mRNA [NM_153840]	21,1
A_23_P254271	TUBB6	Homo sapiens tubulin, beta 6 class V (TUBB6), mRNA [NM_032525]	20,8
A_33_P3399571	VNN1	Homo sapiens vanin 1 (VNN1), mRNA [NM_004666]	20,2
A_23_P146946	CST6	Homo sapiens cystatin E/M (CST6), mRNA [NM_001323]	19,6
A_23_P139687	ERP27	Homo sapiens endoplasmic reticulum protein 27 (ERP27), mRNA [NM_152321]	18,8
A_23_P365218	GPR110	Homo sapiens G protein-coupled receptor 110 (GPR110), transcript variant 2, mRNA [NM_025048]	15,3
A_33_P3286066	PHLDB2	Homo sapiens pleckstrin homology-like domain, family B, member 2 (PHLDB2), transcript variant 1, mRNA [NM_001134438]	15,3
A_23_P380208	VEPH1	Homo sapiens ventricular zone expressed PH domain homolog 1 (zebrafish) (VEPH1), transcript variant 1, mRNA [NM_024621]	14,6
A_23_P45011	PPP1R14C	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14C (PPP1R14C), mRNA [NM_030949]	14,6
A_23_P2492	C1S	Homo sapiens complement component 1, s subcomponent (C1S), transcript variant 2, mRNA [NM_001734]	13,8
A_24_P29733	CDK14	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 14 (CDK14), mRNA [NM_012395]	12,9
A_23_P28507	MGAT4A	Homo sapiens mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A (MGAT4A), transcript variant 1, mRNA [NM_012214]	12,8
A_24_P928052	NRP1	Homo sapiens neuropilin 1 (NRP1), transcript variant 1, mRNA [NM_003873]	12,7
A_23_P151075	ARHGDIB	Homo sapiens Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta (ARHGDIB), mRNA [NM_001175]	12,6
A_23_P153480	KLK5	Homo sapiens kallikrein-related peptidase 5 (KLK5), transcript variant 1, mRNA [NM_012427]	12,6
A_33_P3306110	CALCRL	Homo sapiens calcitonin receptor-like (CALCRL), mRNA [NM_005795]	12,2
A_23_P210465	PI3	Homo sapiens peptidase inhibitor 3, skin-derived (PI3), mRNA [NM_002638]	12,1
A_23_P162579	HSPB8	Homo sapiens heat shock 22kDa protein 8 (HSPB8), mRNA [NM_014365]	12,0
A_24_P228149	KRT13	Homo sapiens keratin 13 (KRT13), transcript variant 2, mRNA [NM_002274]	11,8
A_23_P253123	VGLL1	Homo sapiens vestigial like 1 (Drosophila) (VGLL1), mRNA [NM_016267]	11,3
A_33_P3261957	CALCRL	Homo sapiens calcitonin receptor-like (CALCRL), mRNA [NM_005795]	10,4

A_23_P76488	EMP1	Homo sapiens epithelial membrane protein 1 (EMP1), mRNA [NM_001423]	9,9
A_23_P26124	RORA	Homo sapiens RAR-related orphan receptor A (RORA), transcript variant 2, mRNA [NM_134260]	9,1
A_32_P111639	CHST9	Homo sapiens carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 9 (CHST9), transcript variant 1, mRNA [NM_031422]	8,5
A_23_P55616	SLC14A1	Homo sapiens solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group) (SLC14A1), transcript variant 4, mRNA [NM_001146037]	8,3
A_24_P250922	PTGS2	Homo sapiens prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (PTGS2), mRNA [NM_000963]	8,3
A_23_P205959	ALDH1A3	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 (ALDH1A3), mRNA [NM_000693]	8,3
A_33_P3358208	PADI1	Homo sapiens peptidyl arginine deiminase, type I (PADI1), mRNA [NM_013358]	8,2
A_23_P209055	CD22	Homo sapiens CD22 molecule (CD22), transcript variant 1, mRNA [NM_001771]	8,2
A_33_P3306103	CALCRL	Homo sapiens calcitonin receptor-like (CALCRL), mRNA [NM_005795]	8,1
A_23_P60990	C2orf54	Homo sapiens chromosome 2 open reading frame 54 (C2orf54), transcript variant 2, mRNA [NM_024861]	7,7
A_24_P190472	SLPI	Homo sapiens secretory leukocyte peptidase inhibitor (SLPI), mRNA [NM_003064]	7,1
A_32_P720220	C12orf36	Homo sapiens chromosome 12 open reading frame 36 (C12orf36), non-coding RNA [NR_036555]	7,0
A_24_P291826	SYTL3	Homo sapiens synaptotagmin-like 3 (SYTL3), transcript variant 3, mRNA [NM_001009991]	6,8
A_23_P319598	C4BPB	Homo sapiens complement component 4 binding protein, beta (C4BPB), transcript variant 1, mRNA [NM_000716]	6,6
A_23_P251293	SNCG	Homo sapiens synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1) (SNCG), mRNA [NM_003087]	6,4
A_23_P104762	YAP1	Homo sapiens Yes-associated protein 1 (YAP1), transcript variant 2, mRNA [NM_006106]	6,1
A_23_P318904	SERTAD4	Homo sapiens SERTA domain containing 4 (SERTAD4), mRNA [NM_019605]	6,0
A_23_P105012	HRASLS2	Homo sapiens HRAS-like suppressor 2 (HRASLS2), mRNA [NM_017878]	5,9
A_23_P42397	PRSS35	Homo sapiens protease, serine, 35 (PRSS35), transcript variant 2, mRNA [NM_153362]	5,8
A_32_P196142	LOC100130938	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC100130938 (LOC100130938), miscRNA [XR_110148]	5,8
A_33_P3306146	PLAU	Homo sapiens plasminogen activator, urokinase (PLAU), transcript variant 2, mRNA [NM_001145031]	5,7

Annexe n°2. Les 50 transcrits les plus augmentées dans les 5F7 YAPdc par rapport aux 5F7 Ctrl. Sont représentés ici les transcrits dont l'augmentation est la plus importante suite à la transfection par le YAP^{S127A}. Les transcrits surlignés en jaune et en vert sont les transcrits décrits comme interagissant avec la voie Hippo ou ses effecteurs ; le vert désigne les transcrits communément retrouvés avec les cellules 5F31 surexprimant le YAP^{S127A}. Les transcrits en rouge sont des transcrits communément retrouvés entre les 5F31 YAP^{S127A} et 5F7 YAP^{S127A} n'ayant pas de lien décrits avec la voie Hippo.