



HAL
open science

Etude des mécanismes moléculaires régulant la voie Hippo via les intégrines $\beta 1$

Hiba Sabra

► **To cite this version:**

Hiba Sabra. Etude des mécanismes moléculaires régulant la voie Hippo via les intégrines $\beta 1$. Biologie du développement. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV026 . tel-02168961

HAL Id: tel-02168961

<https://theses.hal.science/tel-02168961>

Submitted on 30 Jun 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biologie du développement-Oncogénèse**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Hiba Sabra

Thèse dirigée par **Daniel Bouvard** et
codirigée par **Anne-Sophie Ribba**

préparée au sein de l'**Institut pour l'avancée des biosciences**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

Etude des mécanismes moléculaires régulant la voie Hippo via les intégrines $\beta 1$

Thèse soutenue publiquement le « **29 Juin 2017** »,
devant le jury composé de :

M Franck VERRECCHIA

Directeur de recherche, Nantes, Rapporteur

M Olivier PEYRUCHAUD

Directeur de recherche, Lyon, Rapporteur

M Dominique LALLEMAND

Chargé de recherche, Paris, Examineur

M Laurent GAGNOUX

Chargé de recherche, Nice, Examineur

M Uwe SCHLATTNER

Professeur, Grenoble, Président



***« C'est dans l'effort que l'on trouve la satisfaction et non dans la réussite.
Un plein effort est une pleine victoire »***

~ Gandhi ~

Remerciement

Ce manuscrit est le résultat des travaux de recherche de près de quatre ans, j'adresse mes remerciements à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ces travaux.

En premier lieu, je tiens à remercier Dr. Daniel Bouvard. En tant que directeur de thèse, Dr Bouvard m'a guidé dans mon travail et m'a présenté tous les conseils nécessaires pour l'avancement de ce travail.

Je remercie aussi Dr. Anne-Sophie Ribba pour le temps qu'elle m'a consacré pour les discussions scientifiques, et pour le soutien moral qu'elle m'a présenté tous le long des quatre ans de thèse.

Je souhaite particulièrement remercier Dr. Marc Block pour son avis et ses recommandations qui étaient indispensables pour l'avancement de ce travail. Ainsi que, je remercie Dr Block pour le temps qu'il a accordé à la correction de ce manuscrit.

J'adresse aussi mes remerciements à tous mes collègues au laboratoire. En particulier: Lorrie, Yohan, Aysegul, Chérine et Noémie. Merci d'avoir partagé le bureau, les pleurs et les fous rires. Merci pour toutes les pauses café-thé et aussi les BO BUNs !!!!!!! Bref, tous les moments de folie douce que nous avons partagés.

Et pour finir un grand et spécial merci à mes parents et mes frères. Je vous remercie pour ce que vous avez fait, ce que vous faites et ce que vous ferez pour moi. J'espère que ces pages, et ce qu'elles représentent, soient à la hauteur des sacrifices, de vos attentes, du soutien, de la confiance et des encouragements dont vous faites preuve depuis toujours. Je vous dédie cette thèse.

Table des matières

Résumé	5
Abstract.....	7
Chapitre 1: Introduction.....	9
1.1 Le tissu osseux	10
1.1.1 Vue générale.....	10
1.1.2 Régulation de la prolifération ostéoblastique et de sa différenciation	11
1.2 Les intégrines et l'ostéogenèse	14
1.2.1 Définition des intégrines	14
1.2.2 Structure des intégrines	14
1.2.3 Signalisation bidirectionnelle des intégrines.....	16
1.2.4 Les intégrines et le développement osseux	17
1.2.5 Rôle des interactions intégrines-ECM dans la mécano-transduction	20
1.2.6 La signalisation "outside-in" des intégrines	21
1.2.7 Rôle des intégrines dans le contrôle de la prolifération cellulaire.....	23
1.2.7.1 Intégrines et prolifération	23
1.2.7.2 Intégrines et survie cellulaire	26
1.3 La voie Hippo : répresseur majeur de la prolifération.....	26
1.3.1 Découverte de la voie Hippo	26
1.3.2 La voie Hippo chez les mammifères	27
1.3.3 La voie Hippo et différenciation ostéogénique	29
1.3.4 Interaction cellule-ECM et voie Hippo.....	30

1.3.5	Effet du cross talk entre la voie Hippo et autres voies de signalisation.....	33
1.3.5.1	La voie Wnt/ β -caténine	34
1.3.5.2	La voie TGF β /BMPs	35
1.3.5.3	La voie PI3K/AKT/mTOR.....	37
1.3.5.4	La voie MAPK/ERK	39
1.3.5.5	Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).....	40
1.3.5.6	Le récepteur CD44 et acide hyaluronique	42
1.3.6	Régulation de la voie Hippo chez les Mammifères	43
1.3.6.1	L'inhibition de contact	43
1.3.6.2	Stress cellulaire	45
1.3.6.3	Rôle du cytosquelette	47
1.3.7	Hippo dans l'ostéosarcome	48
1.4	Objectifs de la thèse.....	49
Chapitre 2: Résultats.....		50
2.1	Synthèse des résultats	51
2.1.1	Les intégrines β 1 contrôlent la prolifération des ostéoblastes en contrôlant la localisation nucléaire de YAP	51
2.1.2	Les intégrines β 1 contrôlent la localisation nucléaire de YAP en modulant l'activation de PAK/NF2.....	52
2.1.3	L'intégrine β 1 contrôlent la localisation nucléaire de YAP en modulant la localisation de Rac1.....	52
2.1.4	Les intégrines β 1 contrôlent la localisation membranaire de Rac1 via les vésicules DRM	52

2.1.5	Les intégrines $\beta 1$ stabilisent les microtubules pour induire une localisation membranaire de Rac1 via le trafic des vésicules p18/LAMTOR.....	53
2.1.6	Le ciblage des microtubules par les intégrines $\beta 1$ contrôle la translocation nucléaire de YAP.....	54
2.2	Conclusion.....	54
2.3	Article.....	54
Chapitre 3: Discussion.....		113
3.1	Les intégrines $\beta 1$ contrôlent la prolifération cellulaire....	114
3.2	Les intégrines $\beta 1$ contrôlent YAP d'une façon Rac1 et PAK dépendante	115
3.3	Le trafic DRM/Rac1 vers la membrane plasmique est contrôlé par l'engagement des intégrines $\beta 1$	117
3.4	Le défaut du trafic Rac1/DRM dans les cellules $\beta 1^{-/-}$ est dû au défaut de ciblage des microtubules.....	118
3.5	Les intégrines $\beta 1$ contrôlent la prolifération cellulaire d'une façon NF2/merline dépendante	119
Chapitre 4: Conclusion et perspectives		122
Chapitre 5: Matériels et Méthodes.....		125
5.1	Matériels.....	126
5.1.1	Anticorps, molécules et amorces	126
5.1.1.1	Les anticorps.....	126

5.1.1.2	Les molécules.....	127
5.1.1.3	Les amorces	128
5.1.2	Les bactéries	128
5.1.3	Les ADN plasmidiques	128
5.2	Les méthodes	129
5.2.1	Méthodes de biologie cellulaire	129
5.2.1.1	Génération des lignées cellulaires.....	129
5.2.1.2	Transfection et infection rétrovirale	129
5.2.1.3	Immunofluorescence.....	129
5.2.1.4	Test de prolifération	130
5.2.1.5	Test d'étalement cellulaire	130
5.2.2	Méthodes de biochimie.....	130
5.2.2.1	Electrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide et Western Blot	130
5.2.2.2	Fractionnement cellulaire.....	131
5.2.2.3	Immunoprécipitation.....	131
5.2.2.4	Production de protéines recombinantes en système bactérien et GST-Pull Down	132
5.2.3	Méthodes de biologie moléculaire.....	133
5.2.3.1	Extraction d'ARN.....	133
5.2.3.2	Réaction de RT-qPCR	133
	Références bibliographiques	134

Résumé

L'adhérence cellulaire à la matrice extracellulaire joue un rôle clé dans leur prolifération, leur différenciation ou l'apoptose. Par conséquent ce processus est critique pour un développement normal et pour l'homéostasie tissulaire. La dérégulation de ce mécanisme contribue souvent à des situations pathologiques. Ainsi, la dérégulation de nombreux gènes impliqués dans les adhérences cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire sont liés à des pathologies conduisant à un défaut de développement, la progression tumorale, ou l'inflammation.

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétéro dimériques jouant un rôle majeur dans les interactions cellule-matrice extracellulaire. Ce rôle n'est pas limité à une simple interaction mécanique puisqu'elles permettent également la transduction des signaux de la matrice extracellulaire à la cellule afin de permettre à cette dernière de s'adapter à son micro environnement. Dans le but d'étudier le rôle des intégrines à chaîne $\beta 1$ dans le développement osseux, le laboratoire a mis en place un modèle murin d'inactivation conditionnelle du gène *Itgb1* basée sur l'expression de la recombinaise Cre au stade pré-ostéoblastique. Les souris mutées présentent un défaut de développement osseux, dû à une faible prolifération des ostéoblastes.

Contrairement à ce qui était généralement admis, cette faible prolifération des ostéoblastes est indépendante de la voie classique mettant en jeu la voie classique des MAP kinases. En revanche, elle est contrôlée par la voie Hippo: cette signalisation a été récemment identifiée chez la Drosophile et les Mammifères comme un mécanisme inhibiteur majeur de la prolifération cellulaire. Le cofacteur de transcription YAP, effecteur final de cette voie, est une navette nucléo-cytoplasmique. Son expression est amplifiée dans divers cancers dont l'ostéosarcome où cette surexpression associée à celle de l'*Itgb1* est un facteur de mauvais pronostic.

Mes travaux consistent à comprendre comment les intégrines à chaîne $\beta 1$ contrôlent la voie Hippo, et donc la prolifération. Nous avons confirmé que la délétion des intégrines $\beta 1$

active la phosphorylation de YAP et sa séquestration dans le cytoplasme. En utilisant des techniques de Biologie Cellulaire et de Biochimie, nous avons montré que suite à la délétion de l'Itgb1, les cellules présentent un défaut de trafic vésiculaire réduisant la translocation membranaire de Rac1. La séquestration cytoplasmique de Rac1 diminue l'activation de son effecteur majeur la kinase PAK responsable de la dissociation d'un complexe membranaire d'inactivation composé de la protéine adaptatrice NF2, la kinase LATS et de son effecteur principal YAP. Les intégrines en provoquant la perte de ce complexe induisent la déphosphorylation de YAP, sa translocation nucléaire et donc stimulent la prolifération cellulaire.

Mots Clés: Hippo, Intégrines, Trafic vésiculaire, Rac1, PAK.

Abstract

Cell adhesion to the extracellular matrix plays a key role in their proliferation, differentiation or apoptosis. Therefore, this process is critical for normal development and tissue homeostasis. The deregulation of this mechanism often contributes to pathological situations. Thus, the deregulation of many genes involved in cell-cell or cell-extracellular matrix adhesions are linked to pathologies leading to developmental defects, tumor progression, or inflammation.

Integrins are heterodimeric transmembrane receptors that play a major role in cell-extracellular matrix interactions. This role is not limited to a simple mechanical interaction since integrins also allow the transduction of the signals from the extracellular matrix to the cell in order to permit the latter to adapt to its microenvironment. In order to study the role of $\beta 1$ integrins in bone development, the laboratory has implemented a mouse model with conditional inactivation of the *Itgb1* gene based on the expression of recombinase Cre at the pre-osteoblastic stage. The mutated mice show a defect in bone development due to a low proliferation rate of osteoblasts.

Contrary to what was generally accepted, this reduced proliferation is independent of the classical pathway involving the classical pathway of MAP kinases. On the other hand, it is controlled by Hippo: this signaling pathway has recently been identified in *Drosophila* and Mammals as a major inhibitory mechanism of cell proliferation. The transcription cofactor YAP, the end effector of this pathway, is a nucleo-cytoplasmic shuttle. Its expression is amplified in various cancers including osteosarcoma where this overexpression associated with that of *Itgb1* is a factor of poor prognosis.

My work involves understanding how $\beta 1$ integrins control the Hippo pathway, and thus proliferation. We confirmed that deletion of $\beta 1$ integrins activates the phosphorylation of YAP and its sequestration in the cytoplasm. Using Cell Biology and Biochemistry techniques, we showed that following the deletion of *Itgb1*, the cells exhibit a defect in vesicular traffic that reduces the membrane translocation of Rac1. The cytoplasmic sequestration of Rac1

decreases the activation of its major effector, the PAK kinase. PAK is responsible for the dissociation of an inactivating membrane complex composed of the adaptor protein NF2, the LATS kinase, and its main effector YAP. The integrins by provoking the loss of this complex induce the dephosphorylation of YAP, its nuclear translocation, and thus stimulate cell proliferation.

Keywords: Hippo pathway, Integrins, vesicular trafficking, Rac1, PAK.

Chapitre 1: Introduction

1.1 Le tissu osseux

1.1.1 Vue générale

Le tissu osseux est un tissu conjonctif minéralisé qui présente quatre types de cellules: les ostéoblastes, les cellules bordantes, les ostéocytes et les ostéoclastes ainsi qu'une matrice extracellulaire constituée d'une fraction organique et d'une fraction minérale [1]. Le tissu osseux a plusieurs fonctions essentielles: de soutien du corps de protection des organes, de protection du système nerveux, un rôle mécanique dans la locomotion, un rôle métabolique car ce tissu constitue la réserve de calcium et de phosphate de l'organisme, un rôle dans l'hématopoïèse: il contient la moelle osseuse qui produit les globules blancs et rouges ainsi que les plaquettes.

Malgré son aspect inerte, l'os est un tissu hautement dynamique qui est continuellement résorbé par les ostéoclastes et néoformé par les ostéoblastes en réponse aux changements des forces mécaniques, aux modifications du taux de calcium et aux facteurs paracrines et endocrines. L'action conjuguée des ostéoclastes avec les ostéoblastes permet de renouveler le tissu osseux régulièrement au cours d'un processus appelé remodelage osseux. Le remodelage osseux est un processus très complexe par lequel l'ancien tissu osseux est remplacé par un nouveau tissu, dans un cycle composé de trois phases: (1) l'initiation de la résorption osseuse par les ostéoclastes, (2) l'inversion : c'est l'étape de transition entre la dégradation et le dépôt de la nouvelle matrice osseuse (3) la formation osseuse par les ostéoblastes (Figure 1.1) [1].

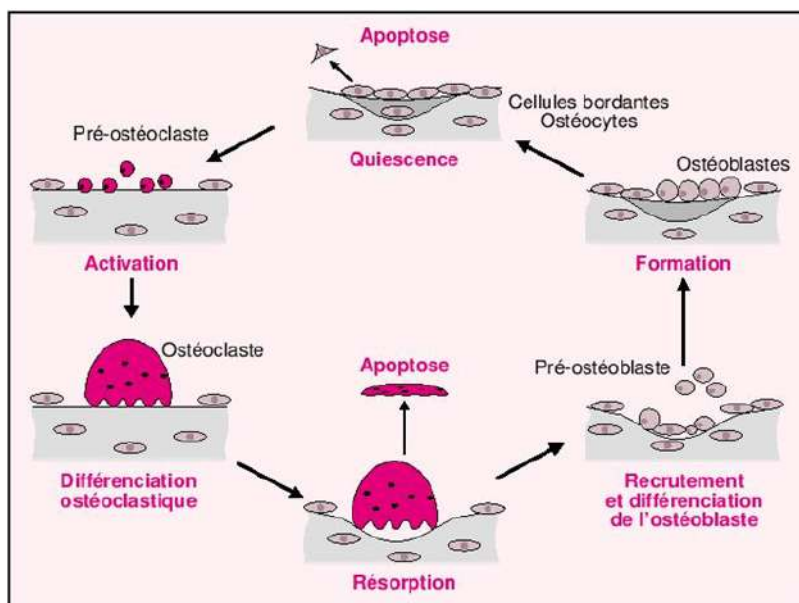


Figure 1.1 : Le cycle du remodelage osseux. Le cycle commence par une phase d'activation caractérisée par la différenciation des cellules ostéoclastiques, suivie d'une phase de résorption, caractérisée par la dégradation de la matrice osseuse par les ostéoclastes. Après cette étape, les ostéoclastes meurent en apoptose et les pré-ostéoblastes se différencient en ostéoblastes matures et synthétisent la nouvelle matrice osseuse. A la suite de cette étape, les ostéoblastes deviennent des cellules bordantes, des ostéocytes ou rentrent en apoptose [2].

1.1.2 Régulation de la prolifération ostéoblastique et de sa différenciation

La formation du tissu osseux nécessite la prolifération et la différenciation de cellules souches (cellules souches mésenchymateuses multipotentes) qui va conduire à la production de nouvelles cellules ostéoblastiques responsables du dépôt et de la minéralisation de la matrice osseuse.

Cette différenciation est régulée par une variété de signaux, comprenant non seulement des facteurs de croissance mais également la nature même de l'environnement matriciel. En effet, la rigidité/élasticité de la matrice extracellulaire (ECM) contrôle directement l'engagement des cellules vers une décision cellulaire (Figure 1.2) [3]. En raison des difficultés de manipulation de la rigidité tissulaire *in vivo*, des études sur le rôle de l'élasticité dans la régulation du comportement des cellules souches ont débuté avec le développement de technologies *in vitro* capables de modifier l'élasticité de l'environnement extracellulaire. Engler et al ont montré qu'en modulant l'élasticité de la matrice sur laquelle les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) étaient cultivées, ils contrôlaient la spécification de la lignée [4]. En effet, en ajustant la rigidité de l'environnement matriciel pour mimer celui du

cerveau (0,1-1 kPa), du muscle (8-17 kPa) et de l'os (> 34 kPa), les auteurs ont été capables de différencier les cellules vers respectivement la lignée neuronale, musculaire et osseuse. D'autre part, Rowlands et al ont montré que la rigidité de l'ECM ne contrôle pas seule le devenir des MSCs, la composition de l'ECM joue aussi un rôle [5]. En effet, les cellules MSCs se différencient en cellules ostéogéniques quand elles sont cultivées sur du collagène I et non pas sur du substrat fibronectine, laminine, ou le collagène IV.

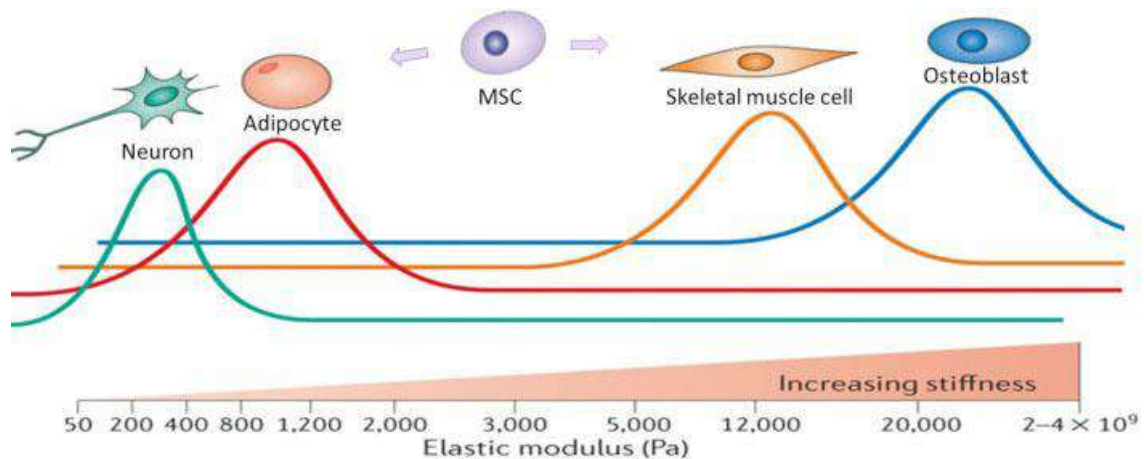


Figure 1.2 : Augmentation de l'élasticité de l'ECM : *in vitro*, les MSCs se différencient en différentes lignées en fonction de l'élasticité de l'ECM (Les pics représentent une différenciation maximale, Pa : Pascale) [6].

Donc la physico chimie de l'ECM est capable de déterminer le devenir des cellules ostéoprogénitrices en ostéoblastes. L'interaction cellule/ECM se fait principalement par des récepteurs hétéro dimériques, les intégrines. Les intégrines présentes au niveau des ostéoblastes sont $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$ (récepteurs du collagène) et $\alpha5\beta1$ (récepteur majeur de la fibronectine). Les intégrines communiquent à la cellule des informations chimiques et physiques sur la nature du microenvironnement, déclenchant ou non des cascades enzymatiques qui *in fine* induiront la prolifération/différenciation ostéoblastique (voir partie les intégrines).

A l'échelle moléculaire, la différenciation des MSCs en ostéoblastes exige un processus complexe d'étapes de prolifération et de différenciation. Ce processus implique l'expression des facteurs de transcription: Dlx5 (Distal-Less homeobox 5), Osx (osterix) et Runx2 (Runt-related transcription factor 2). Runx2 et Dlx5 sont des marqueurs précoces de la différenciation des MSCs en pré-ostéoblastes. A ce stade, les cellules arrêtent de proliférer

et se différencient en ostéoblastes immatures exprimant l'Osx puis deviennent des ostéoblastes matures. Les ostéoblastes matures expriment diverses protéines telles que la phosphatase alcaline (ALP), l'ostéocalcine (OCN) etc...

Les facteurs de transcription sont activés par nombreux facteurs solubles tels que le TGF β (tumor growth factor β) et les BMPs (bone morphogenetic proteins), favorisant ainsi la formation osseuse. De plus la voie Wnt/ β -caténine joue également un rôle dans la formation osseuse. Elle stimule la prolifération des précurseurs ostéoblastiques ainsi que leur différenciation et inhibe la différenciation adipogénique [7] (Figure 1.3).

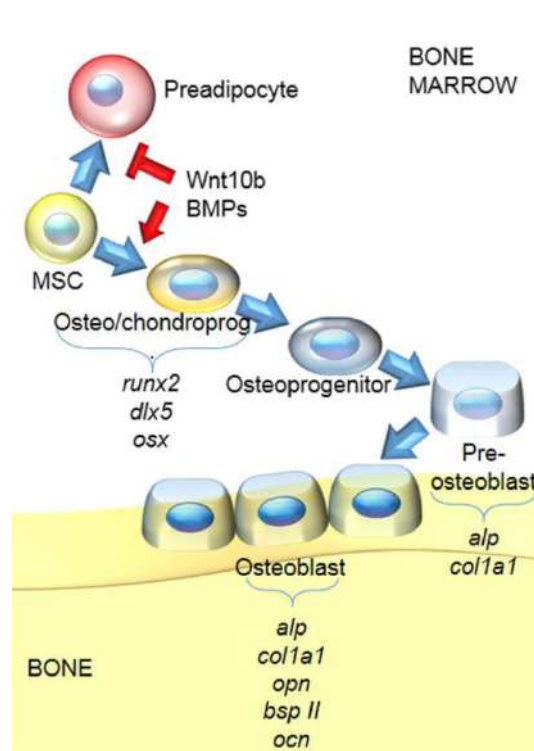


Figure 1.3 : Différenciation ostéoblastique d'une cellule souche mésenchymateuse, voies de signalisation impliquées et expressions géniques [7].

Runx2 est le facteur majeur de la différenciation ostéoblastique. En effet, il a été montré que les souris Runx2 nulles sont dépourvues d'ostéoblastes [8]. L'activité Runx2 est contrôlée par des cofacteurs de transcription YAP et TAZ inhibés par la voie Hippo, une voie de signalisation récemment identifiée dans les mécanismes de l'inhibition de contact de la prolifération et la différenciation. L'interaction cellule-ECM et donc les intégrines régulent également la voie Hippo et potentiellement contrôlent le développement osseux.

1.2 Les intégrines et l'ostéogenèse

La plupart des cellules des organismes multicellulaires sont en contact les unes avec les autres et/ou avec la matrice extracellulaire (ECM). Les contacts cellule-matrice et cellule-cellule sont essentiels pour l'intégrité et l'homéostasie des tissus. Les récepteurs majeurs qui interviennent dans ces interactions peuvent être regroupés en quatre familles de protéines: les cadhérines, les membres de la superfamille des immunoglobulines, les sélectines, et les intégrines.

1.2.1 Définition des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines qui jouent un rôle majeur dans l'adhérence cellulaire. Elles forment un lien dynamique entre les protéines d'adhérence extracellulaires (les collagènes I et IV, la laminine, la fibronectine, la vitronectine, le fibrinogène) et le cytosquelette d'actine intracellulaire.

Depuis leur première caractérisation il y a 25 ans [9], une quantité importante de travaux de recherche a été réalisée, ayant permis la compréhension du rôle essentiel des intégrines dans l'organisation des tissus et le développement cellulaire et la mise en évidence des mécanismes de transduction. Les connaissances actuelles laissent envisager que les intégrines peuvent être des cibles thérapeutiques pour le traitement des cancers.

1.2.2 Structure des intégrines

Les intégrines sont des hétéro dimères, composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β liées entre elles par des liaisons non covalentes. Chez les mammifères, il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β . Les différentes combinaisons connues des sous-unités α et β forment 24 hétéro dimères différents [10], comme le montre la Figure 1.4.

La spécificité du ligand est fortement dépendante de la sous-unité α [11]. Les intégrines peuvent ainsi être divisées en quatre groupes principaux, comme le montre la Figure 1.4, en fonction de leur spécificité de liaison de ligand et de leur fonction :

- Les intégrines liant les laminines : ils contiennent les sous-unités $\alpha3$, $\alpha6$ et $\alpha7$
- Les intégrines liant le collagène : ils contiennent les sous-unités $\alpha1$, $\alpha2$, $\alpha10$ et $\alpha11$.

- Les intégrines liant les séquences d'acides aminés RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) présentent par exemple dans la fibronectine, la vitronectine, le fibrinogène [12]: Ils contiennent les sous-unités α IIb, α 5, α 8 et α V.
- Les intégrines leucocytaires à chaîne β 2 sont souvent impliquées dans l'adhésion cellule-cellule, grâce à des molécules telles que ICAM (intercellular adhesion molecule) et les protéines présentes dans le plasma sanguin [13]: Ils contiennent les sous-unités α L, α M, α X, α D, α E, α 9 et α 4.

Chaque sous-unité se compose d'un grand domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique. L'association entre d'une sous-unité α et d'une sous-unité β est principalement médiée par les régions extracellulaires et transmembranaires. Le domaine extracellulaire contient un site MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site). La liaison du ligand se produit par l'intermédiaire d'une coordination de l'ion Mg^{2+} dans le site MIDAS [14]. Le domaine cytoplasmique contribue également à la dimérisation et/ou la stabilisation du récepteur [15]. Les domaines cytoplasmiques des intégrines se connectent indirectement au réseau des filaments d'actine et sont nécessaires pour la signalisation médiée par les intégrines (signalisation outside-in). Cette connection se fait grâce à l'interaction avec des protéines intracellulaires spécifiques [16] telles que, la Taline, Kindline ou bien FAK (focal adhesion kinase). Les domaines cytoplasmiques jouent un rôle dans la régulation de la conformation du domaine extracellulaire induisant une exposition du site de liaison du ligand (signalisation inside-out).

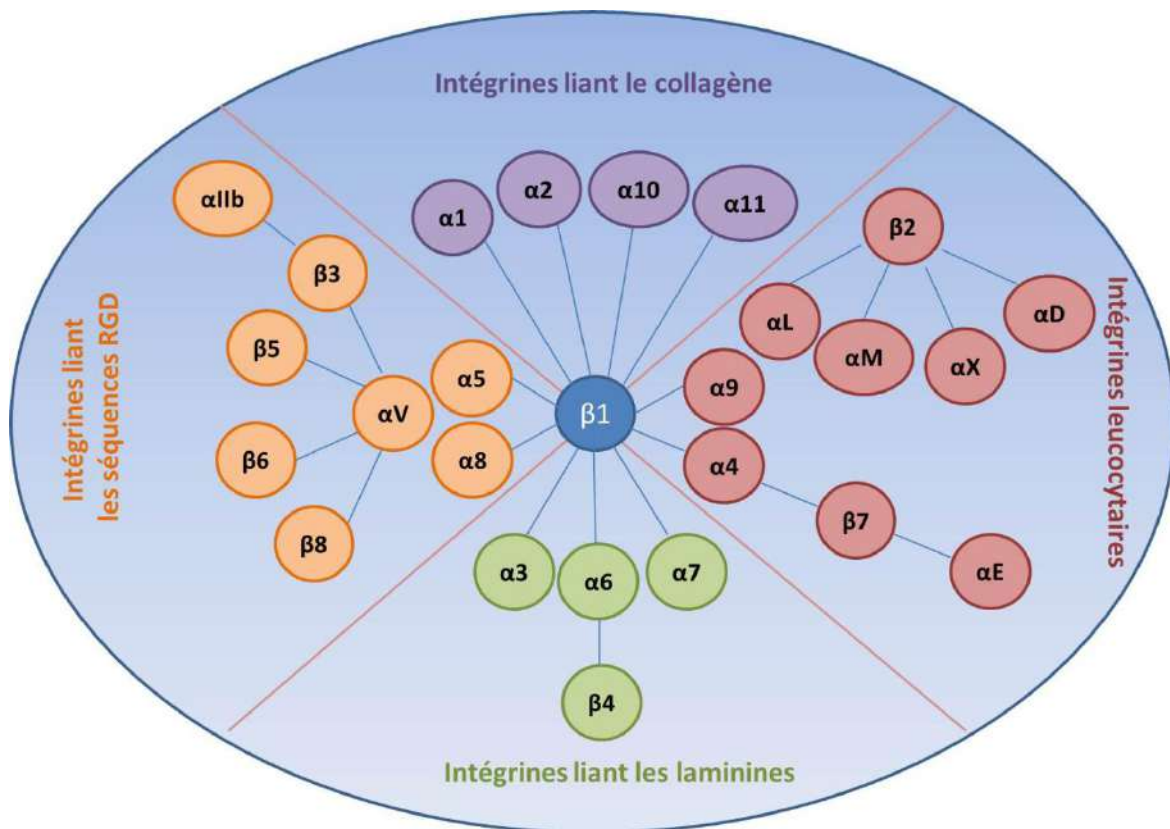


Figure 1.4: Représentation de la famille des intégrines. Chez les vertébrés, il existe 24 hétérodimères. Chaque hétérodimère peut se lier à un ligand. En fonction de la sous-unité α présente, les intégrines se divisent en 4 groupes : Les récepteurs liant le collagène, liant les séquences RGD, liant les laminines et les intégrines leucocytaires.

1.2.3 Signalisation bidirectionnelle des intégrines

A l'état de repos, les intégrines adoptent une conformation fermée qui leur confère une affinité faible ou nulle pour leur substrats extracellulaires [17]. Dans cet état de faible affinité des intégrines, les queues cytoplasmiques des sous-unités α et β sont «jointes» ensemble. Cette conformation est stabilisée par la liaison de la protéine ICAP-1 (Integrin Cytoplasmic Domain Associated Protein-1) à la sous unité β [18]. La signalisation «inside-out» agit principalement pour amener l'intégrine dans l'état de conformation active de haute affinité. Comme mentionné précédemment la Taline et Kindline régulent l'activation des intégrines. En effet, la liaison de la protéine Taline à la région intracellulaire cytoplasmique de l'intégrine β provoque des changements conformationnelles tel que la dissociation des domaines transmembranaires et cytoplasmiques [10]. La famille des Kindlines contribuent également à l'activation de la signalisation inside-out en servant de co-

activateur pour l'activation médiée par la Taline [19]. Après la séparation des sous-unités α et β , les intégrines changent de conformation pour passer à un état d'affinité intermédiaire (sans liaison au ligand) puis à un état d'affinité élevée (liaison au ligand). Cette conformation active permet la liaison des intégrines aux protéines de la matrice extracellulaire (Figure 1.5). La stabilisation de la liaison des intégrines à la matrice extracellulaire initialise une signalisation dite «outside-in». Cette signalisation préside à la formation d'adhérences focales, la formation des fibres de stress d'actine, l'activation des Rho GTPases, de promouvoir la prolifération cellulaire et la survie des cellules.

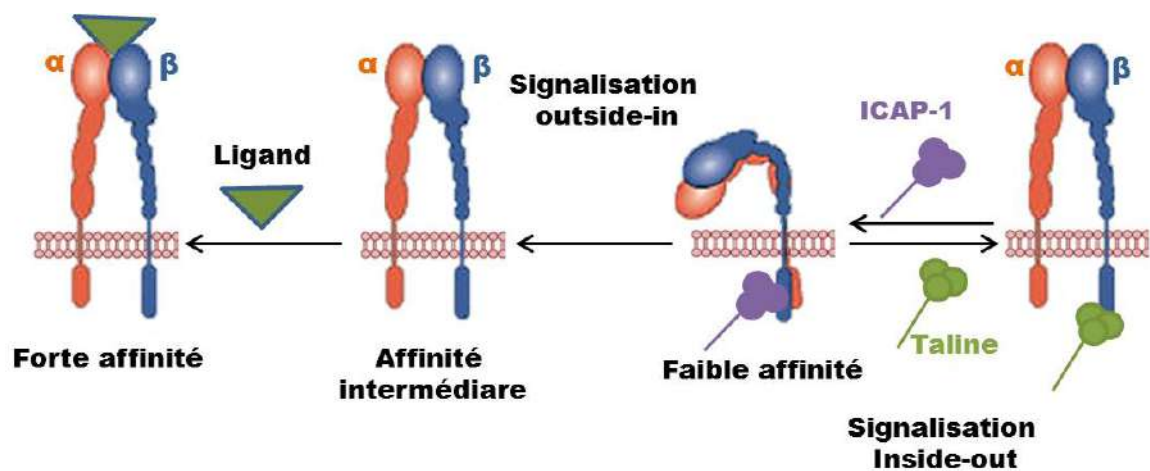


Figure 1.5: Activation des intégrines et signalisation bidirectionnelle. La liaison d'un inhibiteur intracellulaire tel qu'ICAP-1 à la sous-unité β maintient l'intégrine dans une conformation inactive, par ailleurs la liaison d'un activateur intracellulaire tel que la protéine taline à la sous-unité β des intégrines, induit des changements conformationnels conduisant à une augmentation de l'affinité des intégrines pour les ligands extracellulaires. C'est le processus d'activation des intégrines. Suite à une signalisation Inside-out, les intégrines régulent la migration cellulaire, l'adhésion etc... La signalisation outside-in, initiée par la liaison d'un ligand extracellulaire, régule des événements cellulaires tel que la prolifération cellulaire, la survie des cellules etc...

1.2.4 Les intégrines et le développement osseux

Le squelette est maintenu pendant la vie adulte par le remodelage osseux, un processus qui assure le renouvellement continu de la matrice osseuse. Comme déjà mentionné, Le remodelage osseux implique les ostéoclastes, qui résorbent la matrice osseuse calcifiée, et les ostéoblastes, responsables de la synthèse de la matrice osseuse. Avec l'âge, une perte osseuse est associée à des changements significatifs dans le remodelage osseux caractérisés par une diminution de la formation par rapport à la résorption osseuse, entraînant une

fragilité osseuse et un risque accru de fractures. Actuellement, un nombre limité de molécules thérapeutiques sont disponibles pour stimuler la formation osseuse [20] [21].

Chez la plupart des espèces, la différenciation ostéogénique des MSCs peut être favorisée par des protéines morphogénétiques osseuses (BMP) [22] ou des protéines Wnt [23], qui induisent des signaux activant le facteur de transcription ostéoblastique Runx2. De plus, des stratégies thérapeutiques émergentes mettant en jeu des molécules qui ciblent des intégrines spécifiques dans le but d'augmenter la capacité ostéogénique des cellules ostéoprogénitrices et de favoriser la formation et la réparation osseuse. Des études ont montré que la formation des ostéoblastes est intégrine $\beta 1$ dépendante [24]. En effet, l'interaction des intégrines $\alpha 5\beta 1$ avec l'ECM est nécessaire pour la maturation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures (Figure 1.6).

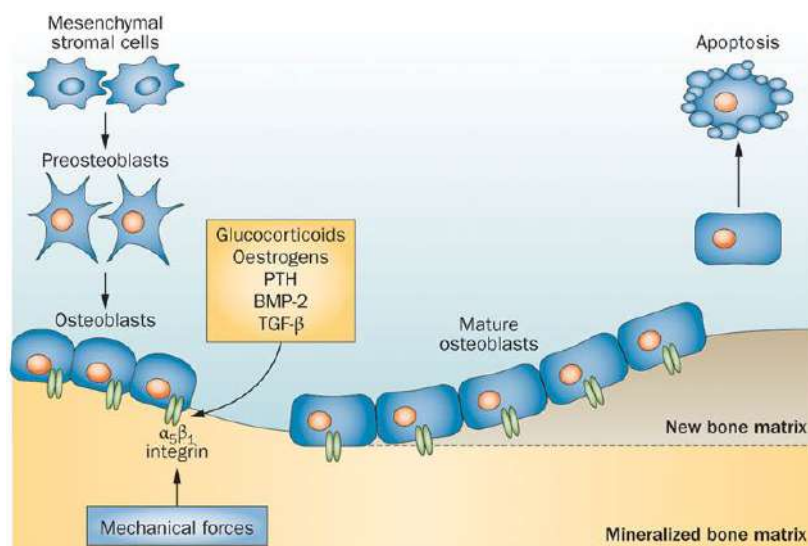


Figure 1.6 : Rôle des intégrines dans le développement osseux : Dans le squelette, la formation osseuse se caractérise par la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en pré-ostéoblastes qui deviennent des ostéoblastes mature et synthétisent la matrice osseuse, avant de rentrer en apoptose. Certaines intégrines, telles que $\alpha 5\beta 1$, ont un rôle essentiel dans l'attachement cellulaire à la matrice extracellulaire, dans la fonction ostéoblastique et la survie cellulaire [24].

Bien que plusieurs intégrines soient exprimées par les cellules osseuses, seulement quelques-unes sont connues pour avoir un rôle dans l'ostéogénèse, notamment, les intégrines à chaîne $\beta 1$ (Tableau 1). En particulier, l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ joue un rôle spécifique dans la formation osseuse, la délivrance ciblée d'un peptidomimétique substrat de $\alpha 4\beta 1$ peut favoriser la différenciation ostéogénique des MSCs et entraîne une augmentation de la

formation osseuse ainsi qu'une augmentation de la masse osseuse [24]. Afin de déterminer le rôle des intégrines $\beta 1$ au niveau des ostéoblastes in vivo, Phillips et al ont délété l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéocytes corticaux, en utilisant le système cre-lox [25]. Ils ont montré que, suite à la délétion de l'intégrine $\beta 1$ à ce stade, les os des souris KO ne présentaient aucune modification géométrique comparés aux souris sauvages. Toutefois, un rôle mécano-senseurs de l'intégrine $\beta 1$ ostéocytaire a été démontré. En effet, suite à la décharge des membres postérieurs les souris KO présentaient une perte osseuse suivie d'un changement de la morphologie des cellules ostéocytaires [25].

Damsky et al ont également étudié le rôle de l'intégrine dans le développement osseux. Les résultats présentés dans leur étude montrent que la fibronectine joue un rôle dans la différenciation ostéoblastique. En effet, l'interaction des ostéoblastes primaires du calvaire de rat fœtal avec la fibronectine induit la minéralisation des nodules, tandis que le traitement avec un anticorps anti-fibronectine diminue la minéralisation et retarde l'expression des marqueurs de différenciation tels que l'ostéocalcine et la phosphatase alcaline [26]. La dépendance à la fibronectine pour la survie augmente avec le degré de différenciation. Ainsi, la perturbation de l'interaction ostéoblaste différencié/fibronectine à l'aide par exemple d'un anticorps anti-fibronectine déclenche une apoptose massive (Anoïkis). La fibronectine peut favoriser la survie des ostéoblastes matures en transmettant un signal de survie par l'intermédiaire des récepteurs d'adhérence tels que l'intégrines ou/et en maintenant l'intégrité structurelle globale de l'ECM [27]. Dans le but de comprendre la mécanistique par laquelle les intégrines régulent la survie/apoptose, plusieurs études ont été réalisées et montrent que les signaux de survie sont transduites par FAK et inhibent l'activité apoptotique de la protéine p53 [28].

De façon cohérente avec le rôle des intégrines $\beta 1$ dans la différenciation et la survie ostéoblastique, l'altération de la signalisation $\beta 1$ se traduit par des défauts squelettiques, une diminution de l'activité des ostéoblastes, et un défaut de la croissance des souris [29]. Pour appuyer encore le rôle des intégrines dans l'ostéogenèse, la délétion du régulateur négatif des intégrines $\beta 1$, ICAP-1, entraîne un défaut d'activité des ostéoblastes, de leur prolifération et de leur différenciation [30]. En outre, la diminution d'expression

d'ILK (integrin-linked kinase), une protéine multifonctionnelle adaptatrice qui relie l'intégrine au cytosquelette d'actine dans les ostéoblastes, augmente la minéralisation osseuse. Ainsi que la délétion d'ILK dans les cellules ostéoblastiques augmente l'expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique: pro- α 1(I) collagen (col1A1), Bone Sialoprotein (Bsp) et Osteocalcin (Ocn) [31].

Integrin	Ligand	Potential role
$\alpha_1\beta_1$	Collagen 1	Cell adhesion, differentiation
$\alpha_2\beta_1$	Collagen 1	Cell adhesion, differentiation, survival
$\alpha_4\beta_1^*$	Fibronectin	Cell adhesion, differentiation, bone formation
$\alpha_5\beta_1^*$	Fibronectin	Cell adhesion, differentiation, survival, bone formation, mechanotransduction
$\alpha_v\beta_3$	Fibronectin, bone sialoprotein, vitronectin, osteopontin	Cell adhesion, differentiation
$\alpha_{11}\beta_1$	Collagen 1	Cell adhesion, survival
*Integrins identified to upregulate osteoblastogenesis and bone formation <i>in vivo</i> .		

Tableau 1: Rôles des principaux intégrines impliqués dans l'ostéoblastogenèse [24].

Globalement, ces données indiquent que la génération de signaux spécifiques induits par les interactions intégrine-matrice osseuse, contrôle la différenciation et la formation osseuse.

1.2.5 Rôle des interactions intégrines-ECM dans la mécano-transduction

Comme mentionné précédemment dans le cas des MSCs, la capacité des cellules à détecter la rigidité de l'ECM affecte la régulation de l'activités cellulaires telles que le développement, la cicatrisation des plaies et même la transformation maligne. La rigidité du substrat influence aussi la prolifération, la motilité cellulaire et l'étalement cellulaire. Pour que le substrat ait un tel effet sur les cellules, deux conditions doivent être remplies: les cellules doivent être capables de sonder les propriétés mécaniques du substrat, puis pouvoir répondre en traduisant les signaux mécaniques en signaux biochimiques pour réguler les gènes cibles. Les cellules lient et s'adaptent à la rigidité de l'ECM via les intégrines qui sont des mécano-transducteurs et transforment les forces mécaniques (créées par l'interaction

entre ECM et le cytosquelette), en signaux biochimiques. Les forces mécaniques et la signalisation associée diffèrent en fonction de la rigidité des substrats, et/ou leur organisation spatiale 2D ou 3D. En effet, la morphologie, la structure du cytosquelette et la signalisation des cellules cultivées sur une surface 2D diffèrent de celles des cellules cultivées dans un environnement 3D [32]. Cette différence est due en partie à une différence d'activation des intégrines (Figure 1.7). En effet, sur un substrat 2D in vitro, les cellules fibroblastiques sont polarisées de telle sorte que seule la surface ventrale entre en contact avec le substrat. Dans cet état, les cellules sont généralement bien étalées et seul un ensemble d'intégrines est activé. Néanmoins, quand les cellules sont ensemencées sur une matrice 3D, la totalité des intégrines subie un changement conformationnel et est activée, conduisant à des interactions améliorées de l'intégrine-ECM et à une production accrue d'ECM. La morphologie cellulaire devient plus bipolaire au moins en partie en raison de l'engagement accru des récepteurs sur la surface de la cellule dorsale.

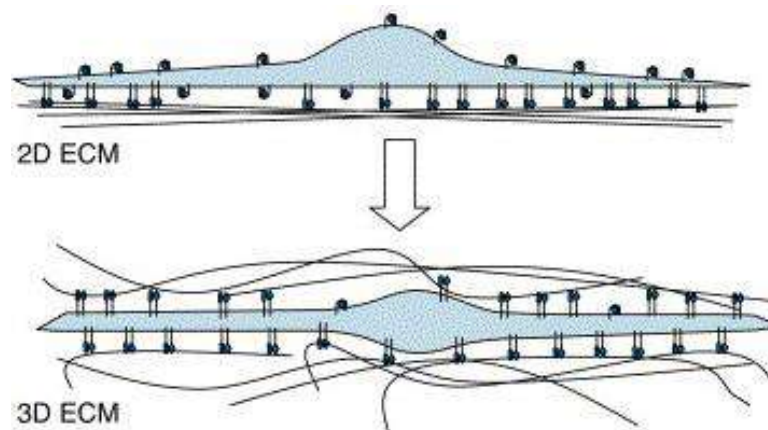


Figure 1.7 : Interaction cellule-ECM et activation des intégrines. Sur un substrat 2D, la surface ventrale entre en contact avec la matrice alors que sur un substrat 3D, la surface dorsale est aussi impliquée [32].

1.2.6 La signalisation "outside-in" des intégrines

D'un point de vue moléculaire, la composition de l'ECM et ses propriétés mécaniques régulent les voies de signalisation situées en aval de l'activation des intégrines. Les récepteurs des facteurs de croissance (GFR) coopèrent avec les intégrines à plusieurs niveaux pour contrôler l'activité cellulaire: en régulant l'affinité de l'intégrine pour les ligands (I), en régulant l'activité des protéines de signalisation associées à l'intégrine telles que FAK,

Src et PI3K (II) et en régulant l'activité des effecteurs en aval tels que ERK, Akt, JNK et Rho GTPases (III) [33] (Figure 1.8).

Le point central de signalisation en aval des intégrines est le complexe Src/FAK, qui active ERK et JNK et ainsi promeut la survie cellulaire, la prolifération, et *in fine* la différenciation. Les intégrines activent la PI3K, qui en collaboration avec ILK et mTOR stimule la survie cellulaire via AKT (Figure 1.8). En outre, grâce à l'activation des voies de signalisation Crk/Dock180 ou alternativement PIX/GIT, le complexe Src/FAK régule l'activité de la famille des protéines Rho GTPase, entraînant ainsi une réorganisation et une régulation du cytosquelette, une régulation de la migration, de l'adhérence et de la polarité.

D'un point de vue osseux, dans les ostéoblastes cultivés *ex vivo*, la différenciation ostéogénique induite par la rigidité de l'ECM est médiée par l'activation de MAPK et de la voie de signalisation RhoA-ROCK. Une culture sur une matrice souple entraîne une diminution de l'activation de la FAK, RhoA et ERK1/2 et donc réduit le niveau d'expression de RUNX2 [31]. En outre, les forces mécaniques peuvent activer la voie de signalisation AKT/GSK3- β / β -caténine, qui à son tour améliore la différenciation des ostéoblastes et diminue la différenciation adipogénique des MSCs *in vitro* [32].

Etant donné que l'interaction entre les cellules osseuses avec leur environnement mécanique est complexe, une compréhension fine de la régulation de la signalisation osseuse est cruciale pour comprendre la physiologie osseuse, l'étiologie des maladies tel que l'ostéoporose, et au développement d'intervention visant à améliorer la résistance de l'os.

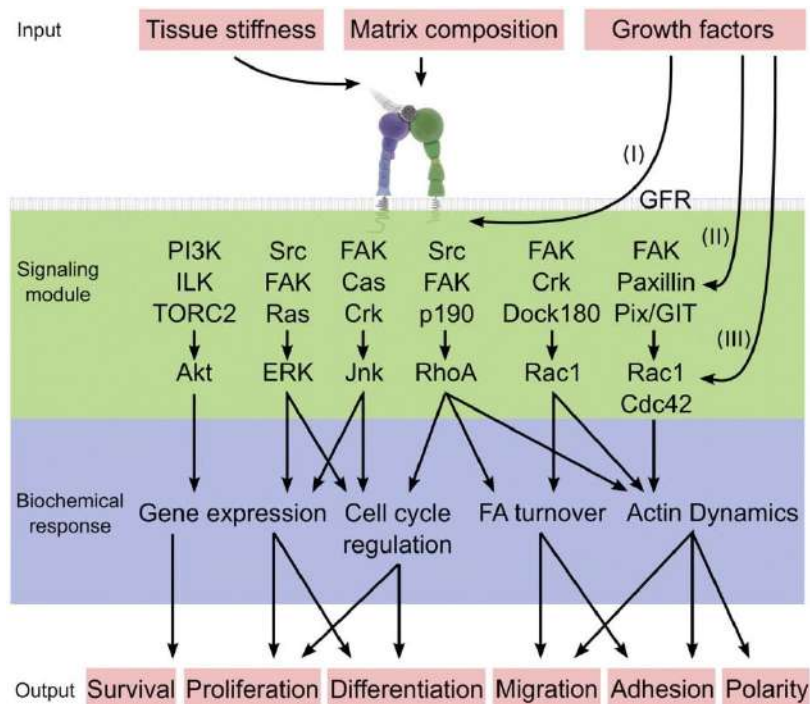


Figure 1.8 : Les réponses cellulaires induites par la signalisation de l'intégrine: En réponse aux propriétés physiques/ chimiques de la matrice et aux facteurs de croissance dans l'environnement, les intégrines se lient à des ligands et s'activent. En conséquence, une variété de voies de signalisation peut être déclenchée principalement par les différentes kinases comme mentionné ci-dessus. Ceux-ci peuvent provoquer des changements dans un ou plusieurs événements cellulaires [33].

1.2.7 Rôle des intégrines dans le contrôle de la prolifération cellulaire

1.2.7.1 Intégrines et prolifération

La prolifération des cellules de mammifères est régulée par divers facteurs environnementaux, principalement l'adhérence à la matrice extracellulaire. Le cycle cellulaire est étroitement régulé par une série de cyclines et les protéines CDKs (cyclin dependent kinases) qui coordonnent les points de contrôle avec la progression du cycle à chaque étape. Le premier point de contrôle du cycle a lieu pendant la phase G1. La cycline D1 est une protéine nécessaire pour la progression dans la phase G1 du cycle cellulaire [34]. Au cours de la phase G1, la cycline D1 est synthétisée rapidement, s'accumule dans le noyau et se dégrade lorsque la cellule entre dans la phase S. L'adhérence cellulaire par l'intermédiaire des intégrines est cruciale pour la progression à travers le cycle cellulaire [35]. En effet, Les intégrines recrutent indirectement des protéines adaptatrices telle que la taline, et les enzymes telle que FAK qui contrôlent des cascades de signalisation. Ces effecteurs régulent les niveaux des cyclines tels que la cycline D1, des CKIs (cyclin-dependent

kinase inhibitors), et la transcription des gènes nécessaires à la prolifération tels que c-Jun et E2F [36]. Le rôle que les intégrines jouent dans la prolifération est si important qu'en l'absence d'intégrines, les cellules métazoaires ne peuvent entrer dans le cycle cellulaire, et donc ne prolifèrent pas. Le modèle classique de la régulation du cycle cellulaire présenté dans les manuels scolaires met en évidence les facteurs de croissance comme le stimulus unique pour déclencher la prolifération. Cependant, il est maintenant établi que l'adhérence via les intégrines est également un élément essentiel exigé pour la prolifération des cellules métazoaires. De plus les cellules normales soit détachées de la matrice extracellulaire ou présentant des délétions au niveau des sous-unités d'intégrines ne peuvent pas progresser dans le cycle cellulaire, même en présence de facteurs de croissance [36] (Tableau 2).

Integrin	Cell type	Effect on proliferation	Reference
$\beta 1$ integrin	Schwann cells	None	Feltri et al. (2002)
$\beta 1$ integrin	Keratinocytes	Decreased	Brakebusch et al. (2000) Raghavan et al. (2000), Grose et al. (2002), López-Rovira et al. (2005)
$\beta 1$ integrin	Pancreatic β -cells	Decreased proliferation, decreased p-FAK, p-Erk and cyclin D1, and increased p21	Riopel et al. (2011), Diaferia et al. (2013)
$\beta 1$ integrin	Mammary epithelial cells	Decreased proliferation and decreased phosphorylation of FAK; increased p21cip1 levels	Li et al. (2005)
$\beta 1$ integrin	Chondrocytes	Decreased	Aszodi et al. (2003)
$\beta 1$ integrin	Cerebellar granule cell precursors	Decreased in cerebellum, high levels of p27-kip1	Blaess et al. (2004)
Transgenic mice expressing a $\beta 1$ integrin chimera with a mutated extracellular domain	Mammary epithelial cells	Reduced proliferation in pregnancy and lactation. Decreased phosphorylation of Erk, Shc and JNK	Faraldo et al. (2001)
Mice expressing a mutated $\beta 1$ integrin-cytoplasmic domain	Mouse embryonic fibroblasts	Reduced proliferation in homozygote embryos	Hirsch et al. (2002)
$\alpha 8\beta 1$ integrin	Kidney cells	Defective growth of the ureteric bud and the ureteric epithelium	Müller et al. (1997)
Mutant mice with a deletion of the cytoplasmic domain of $\beta 4$ integrin	Systemic	Reduced proliferation in skin and intestinal epithelium	Murgia et al. (1998)
$\beta 4$ integrin mutant (deletion of the C-terminal portion of the integrin tail)	Keratinocytes	Decreased	Nikolopoulos et al. (2005)
$\alpha \nu \beta 8$ integrin	Human bronchial cells	Increased proliferation, low levels of secreted TGF- β	Fjellbirkeland et al. (2003)
$\alpha 9$ integrin	Skin keratinocytes and corneal epithelial cells	None, but decreased proliferation was observed after injury	Singh et al. (2009)
$\alpha 10$ integrin	Chondrocytes	Decreased	Bengtsson et al. (2005)
$\alpha 11$ integrin	Fibroblasts from mouse embryos	Decreased	Popova et al. (2007)

Tableau 2 : Effet de la délétion conditionnelle de l'intégrine sur la prolifération dans un modèle murin [36].

Malgré la contribution majeure des intégrines dans la progression du cycle cellulaire, ces dernières ne peuvent pas déclencher la prolifération indépendamment des récepteurs de facteurs de croissance. Il existe différents mécanismes par lesquels les intégrines coopèrent avec les récepteurs GFRs. Dans le premier les intégrines et les GFRs régulent les cyclines de la phase G1 et les kinases en relation avec le cycle cellulaire par l'intermédiaire de différentes voies de signalisation cytoplasmiques. Les principaux effecteurs régulés par les intégrines et les GFRs sont PI3K/AKT, MEK/ERK, et Rac1. Les intégrines contrôlent également l'expression des GFRs au niveau transcriptionnel. Par exemple, le taux de la protéine EGFR

(Epidermal Growth Factor Receptor) diminue dans les cellules épithéliales humaines en suspension [37]. Dans un deuxième mécanisme : Les intégrines coopèrent avec les GFRs par association physique. Les intégrines peuvent alors être activées par les GFRs pour améliorer les signaux mitogéniques, alternativement les GFRs peuvent être activés par les intégrines en absence de facteur de croissance, enfin les intégrines peuvent moduler l'internalisation et le trafic d'endocytose des GFRs [38].

1.2.7.2 Intégrines et survie cellulaire

Les intégrines sont des déterminants essentiels de la survie des cellules et, dans de nombreux cas, la prévention ou l'altération de l'adhérence médiée par les intégrines déclenche une forme d'apoptose qui est connue sous le nom d'anoïkis [39]. En outre si les cellules sont déplacées ou commencent à migrer dans un environnement inapproprié, elles perdent des signaux de survie intégrine dépendante [40]. Par exemple, les cellules épithéliales mammaires sont normalement situées sur une membrane basale riche en laminine, mais, si elles sont déplacées à la matrice extracellulaire de collagène I, elles subissent l'anoïkis [41].

De plus, la perturbation de la fixation des cellules épithéliales et endothéliales à la matrice induit l'apoptose. La survie des cellules médiée par les intégrines est favorisée par la signalisation à travers les voies PI3K/ AKT et ERK [42]. La signalisation par AKT induit la survie cellulaire des cellules épithéliales adhérentes en phosphorylant et séquestrant BAD, qui est une protéine de la famille pro-apoptotique Bcl-2 [43]. Ainsi que, l'activation de la voie PI3K-AKT entraîne la phosphorylation de Bax qui est aussi une protéine pro-apoptotique [44]. Cependant, l'activation de la voie ERK par les intégrines, réduit l'activation de la protéine pro-apoptotique Bim [45].

1.3 La voie Hippo : répresseur majeur de la prolifération

1.3.1 Découverte de la voie Hippo

En 1995, un ensemble d'études menées par Tian Xu sur un modèle mosaïque chez la *Drosophila Melanogaster* a dévoilé un gène suppresseur de tumeur nommé WARTS (Wts). Une mutation inhibitrice du gène WTS entraîne une surcroissance de cellules clonales [46]. Ainsi qu'une perte d'un seul allèle conduit à une prolifération excessive des disques

imaginaires de la mouche [47]. Plus tard, un phénotype similaire a été observé dans d'autres modèles mosaïques lorsque les gènes salvador (SAV), hippo (Hpo) et Mob-as-tumor-suppressor (Mats) ont été mutés [48] [49] [50]. La similitude des phénotypes de surcroissance entre WTS, SAV, Hpo et Mats a suggéré que ces quatre gènes fonctionnent au sein d'une même voie. La nouvelle voie a été reconstituée et intitulée « voie Hippo ». Au cours des études, il a été établi que cette voie réprime la prolifération, au moins en partie, par la régulation de la transcription de la cycline E qui est un régulateur de cycle cellulaire et de Diap 1 (*Drosophila* inhibitor of apoptosis) qui est un inhibiteur de l'apoptose [48] [51] et il semblait naturel de supposer l'existence d'un régulateur de transcription en aval de WTS [50]. D'où la découverte de l'effecteur finale de la voie Hippo, Yorkie (Yki) [52]. Non seulement Yki a été identifié comme un effecteur de la voie Hippo en raison d'une surcroissance suite à sa surexpression mais également il a été identifié comme substrat de la kinase Wts. En effet, Huang J a montré que Yki peut être inactivé par phosphorylation par Wts, lui-même activé par phosphorylation par Hpo et Sav. Comme Yki appartient à une classe de co-régulateurs de transcription qui ne peuvent pas directement se lier à l'ADN, l'identification de la protéine Scalloped (Sd) comme facteur de transcription constitue le lien final entre la voie Hippo et ses effets cellulaires [53].

1.3.2 La voie Hippo chez les mammifères

Des orthologues de la voie Hippo existent chez les mammifères : Mst1/2 (Hpo homologue), WW45 (nommé aussi Sav, Sav homologue), Lats1/2 (Wts homologue), Mob1 (Mats homologue), YAP (Yes-associated protein) et TAZ (Yki homologues). Au cours de l'évolution, il existe un degré élevé de conservation au niveau fonctionnel de la voie Hippo de la *Drosophile* aux Mammifères. En effet, l'expression des orthologues humains YAP, LATS1, MST2, Mob1, restaurent la perte de fonction suite aux mutations des protéines correspondantes chez la *Drosophile* [54].

Comme chez la *Drosophile*, l'association entre MST1/2 et WW45 est essentielle pour la phosphorylation de MST1/2 et l'activation de LATS1/2 [55] [56]. De plus, parmi les 7 protéines Mob humaines, seules Mob1A et Mob1B sont préférentiellement phosphorylés par MST1/2 [57], interagissent avec LATS1/2, augmentent sa phosphorylation et donc son

activation [58]. L'activation de LATS1/2 entraîne la phosphorylation de YAP. Cette phosphorylation s'effectue sur les résidus sérine S61, S109, S127, S164, S381 [55] [59] [60]. La phosphorylation du résidu S127 permet sa rétention cytoplasmique suite à sa séquestration par la protéine 14.3.3 et donc l'inhibition de son activité co-transcriptionnelle [59] [61] [62] [63]. En cohérence avec ce modèle, Zhou et al ainsi que Lu et al montrent que la délétion conditionnelle des gènes MST1/2 et WW45 au niveau du foie des souris entraîne une diminution de la phosphorylation de YAP [64]. En outre, Guan et al ont montré que la phosphorylation S381/S311 (C-terminal phosphodegrons) pour YAP/TAZ respectivement par LATS1/2 initialise la phosphorylation des sites S384/S314 de YAP/TAZ respectivement par la CK1 δ/ϵ (casein kinase 1 delta/epsilon). Cette dernière modification va induire le recrutement de la "SCF β -TrCP E3 ligase complex" qui va poly-ubiquitinyler YAP/TAZ et induire leurs dégradations cytoplasmiques [60] [65]. D'autre part, la protéine Merlin, codée par le gène suppresseur de tumeur NF2 (neurofibromatosis type 2), est un inhibiteur important de l'activité de YAP/TAZ, agissant en amont des kinases LATS et MST [66].

Sous sa forme non phosphorylée, YAP est localisé principalement dans le noyau où en interaction avec le facteur de transcription TEAD (homologue du facteur de transcription Scalloped Sd chez la drosophile) il induit la transcription des gènes cibles dont CTGF (connective tissue growth factor) et Cyr61 (cysteine-rich angiogenic inducer 61). La Figure 1.9 représente les principaux effecteurs de la voie Hippo et la cascade d'activation de ces effecteurs.

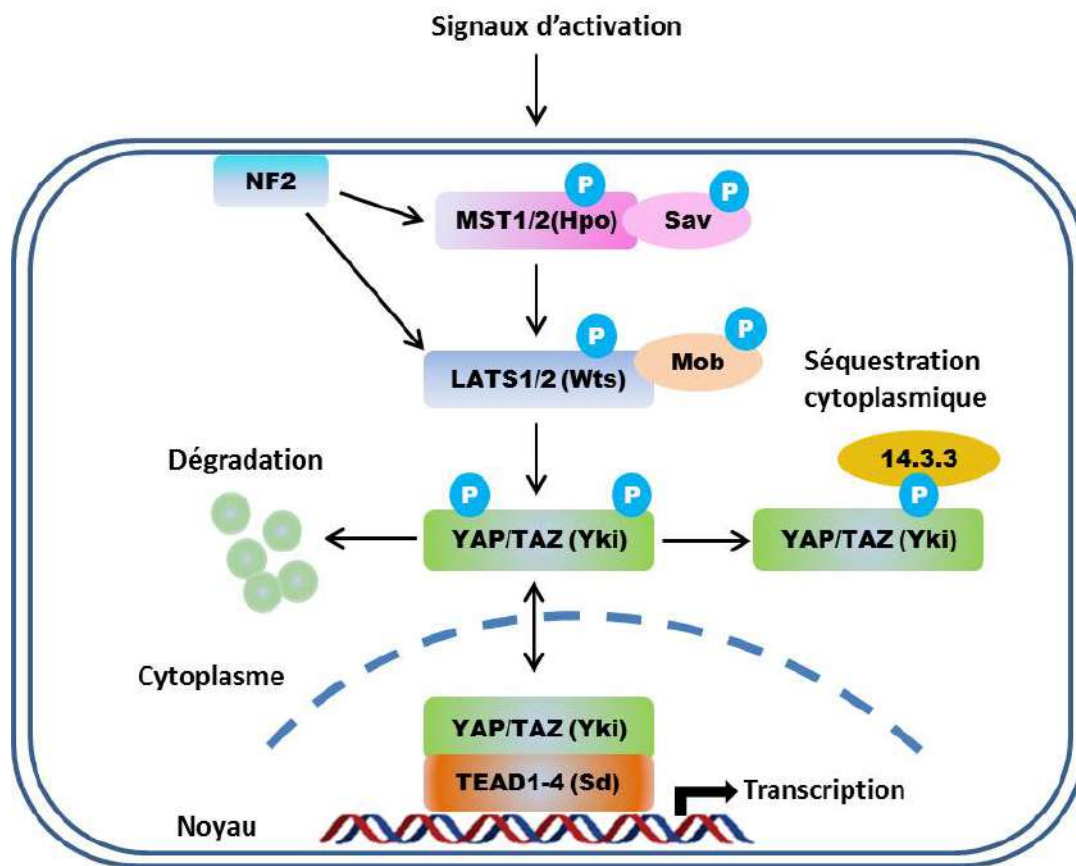


Figure 1.9 : La voie Hippo chez les mammifères, avec entre parenthèse les protéines homologues chez la drosophile. YAP/TAZ (Yki chez la drosophile) sont l'effecteurs finals de la voie Hippo.

1.3.3 La voie Hippo et différenciation ostéogénique

Les ostéoblastes, responsables de la formation osseuse, sont différenciés des cellules mésenchymateuses par l'action des plusieurs facteurs de transcription et cascades de signalisation. La différenciation ostéogénique est coordonnée par le facteur de transcription, RUNX2, et une multitude de co-régulateurs [67], qui activent l'expression de gènes spécifiques des ostéoblastes. Grâce à la liaison directe du domaine WW de TAZ au motif PY de RUNX2, TAZ a été identifié comme un co-activateur transcriptionnel de RUNX2. L'expression d'un mutant constitutivement actif de TAZ augmente l'expression du gène d'ostéocalcine (un marqueur tardive du développement ostéoblastique) de deux à trois fois, alors que l'inhibition de la TAZ dans les MSCs inhibe l'ostéogénèse lorsque les cellules sont cultivées dans des conditions favorisant la différenciation en ostéoblastes [68]. Les souris transgéniques présentant une surexpression spécifique de Taz dans les ostéoblastes ont une

densité minérale osseuse significativement plus élevée, une formation osseuse accrue et une expression plus élevée de RUNX2, d'ostéocalcine, d'ALP et d'ostérix [69].

Bien que le rôle de TAZ dans le soutien de l'ostéogenèse soit clair, le rôle de YAP est plus complexe. Lorsqu'un mutant constitutivement activé de YAP est surexprimé dans les MSCs, la différenciation ostéogénique est favorisée par rapport à la différenciation adipogénique, même dans des conditions favorisant cette dernière [70]. Cependant, YAP peut également agir comme répresseur de RUNX2 lorsqu'il est régulé par des voies non canoniques. Par exemple, l'inhibition des kinases Src ou Yes empêche la phosphorylation de la tyrosine sur YAP et induit la dissociation des complexes Runx2-YAP. Cette dissociation permet l'expression de l'ostéocalcine, un inhibiteur de la minéralisation osseuse [71]. Enfin, des études ont montré que YAP est une cible directe de SOX2, un facteur de transcription important pour le devenir des MSCs. Une forte expression de SOX2 ou de YAP bloque l'ostéogenèse, tandis qu'une délétion de SOX2 ou de YAP augmente l'ostéogenèse [75].

Enfin, Lee et al ont montré que l'inactivation génique de Mst2 induit une perte osseuse chez la souris. Ceci est corrélé avec une augmentation de l'expression de RANKL et une inhibition de l'ostéoblastogenèse [73] tandis que les facteurs de transcription Snail/Slug favorisent la prolifération des MSCs et l'ostéogenèse via l'activation de YAP/TAZ [74].

1.3.4 Interaction cellule-ECM et voie Hippo

Les propriétés physiques et mécaniques du microenvironnement cellulaire régulent la forme des cellules et peuvent fortement influencer le devenir cellulaire et comme indiqué précédemment l'ostéogenèse. Comment les signaux mécaniques sont détectés et comment ils régulent l'expression génique, sont des questions longtemps restées sans réponse. Récemment, les études portant sur la matrice extracellulaire, les sites d'adhérence cellulaire, et le cytosquelette d'acto-myosine, ont convergé vers la régulation des effecteurs finaux de la voie Hippo YAP et TAZ. Cette convergence pourrait expliquer comment les signaux mécaniques régulent le comportement cellulaire normal et pathologique.

Les co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ sont apparus récemment comme des médiateurs des effets biologiques observés en réponse à l'élasticité de l'ECM et à la forme

de la cellule. YAP et TAZ se localisent dans le noyau et sont transcriptionnellement actifs dans des cellules cultivées sur une ECM rigide, tandis que YAP et TAZ sont cytoplasmiques, inactifs quand les cellules sont cultivées sur une ECM souple. En plus, en fonction de l'étalement cellulaire l'activité de YAP/TAZ est déterminée, ce qui affecte les réponses biologiques aux forces mécaniques (Figure 1.10).

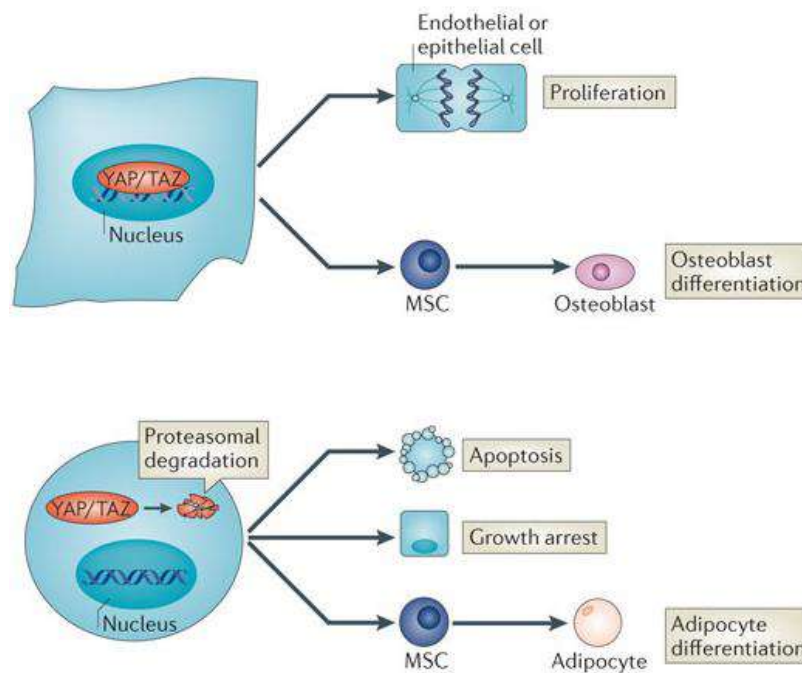


Figure 1.10 : Contrôle de la différenciation cellulaire en fonction de l'étalement cellulaire. Quand les cellules sont bien étalées, YAP/TAZ sont localisés dans le noyau et induisent la prolifération cellulaire ou une différenciation ostéoblastique. Quand les cellules sont rondes, YAP/TAZ sont cytoplasmiques, et donc les cellules rentrent soit en apoptose ou bien se différencient en adipocyte [75].

En accord avec l'idée que la mécano-transduction est étroitement liée à l'intégrité du cytosquelette d'acto-myosine, YAP/TAZ sont inactivés lorsque les filaments d'actines sont dépolymérisés ou lorsque RhoA est inhibé [76]. Les intégrines sont des transducteurs centraux des forces mécaniques de l'ECM. En tant que telle, la signalisation de l'intégrine apparaît clairement en amont de l'activité de YAP/TAZ. Il semble donc probable que l'étalement des cellules en soi et les changements dans les structures des filaments d'actines en aval de la signalisation d'intégrine soient des médiateurs importants pour garder YAP/TAZ actifs.

En effet, lorsque les cellules s'étalent sur l'ECM ou lorsque les cellules sont cultivées sur une ECM rigide, les forces extracellulaires favorisent les adhérences cellule-ECM par l'intermédiaire des intégrines et la réorganisation des filaments d'actine contenant des molécules de myosine. La contraction des filaments d'actine favorise la localisation nucléaire de YAP/TAZ (Figure 1.11).

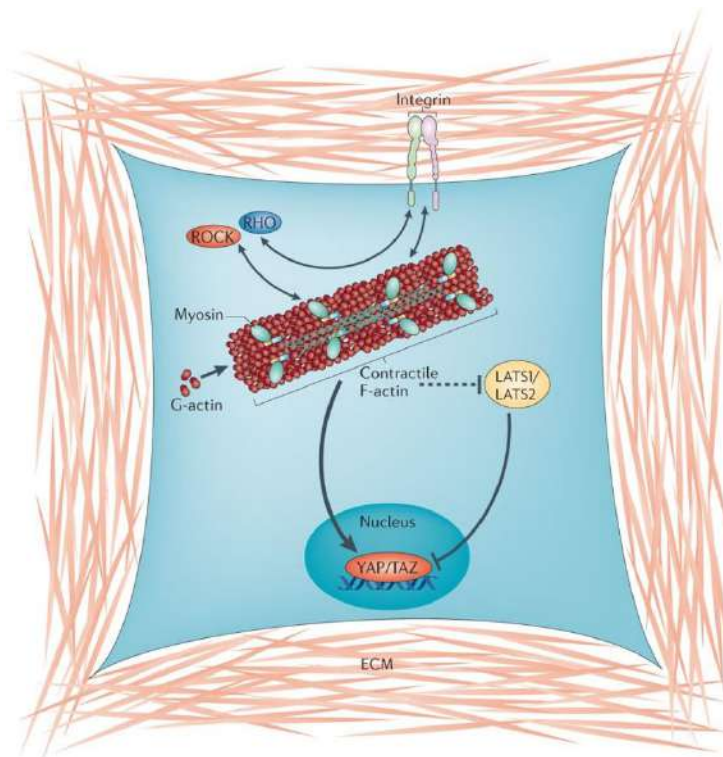


Figure 1.11 : Un modèle pour la régulation mécanique de YAP/TAZ [75].

D'autre part, Kim et al ont montré que l'adhérence à la fibronectine stimule l'axe de signalisation FAK-Src-PI3K qui est un régulateur négatif de la voie Hippo [77]. D'autres études ont suggéré également le rôle des intégrines dans la régulation de l'activité de YAP. Tang et al ont montré que l'expression d'une forme constitutivement active de l'intégrine $\beta 1$ dans les MSCs induit une activation de FAK et donc une localisation nucléaire de YAP, ce qui contrôle l'engagement des MSCs vers l'ostéogenèse et non vers l'adipogenèse [78]. En outre, la stimulation mécanique des ostéoblastes induit l'activation (translocation nucléaire) de YAP d'une manière Src dépendante qui est inhibée dans les ostéoblastes déficients en intégrine αv [79].

En outre, la MT1-MMP (membrane type 1-matrix metalloproteinase) dirige l'engagement et la différenciation des lignées MSCs en remodelant l'ECM, déclenchant ainsi l'activation de l'intégrine $\beta 1$ et initiant une cascade de signalisation Rho GTPases en aval conduisant à la localisation nucléaire des co-facteurs de transcription YAP/TAZ. Ceci stimule l'ostéogénèse et inhibe l'adipogénèse [30] (Figure 1.12).

En plus des voies décrites ci-dessus, il est a été montré que l'ILK joue un rôle critique dans l'inhibition de la voie Hippo. En bloquant la phosphorylation de la myosine phosphatase (MYPT1-PP1), elle conduit à l'inactivation de la protéine adaptatrice NF2, une délocalisation des kinases LATS1/2 et induit diminution de la phosphorylation de YAP l'un de ses substrat majeur, et en conséquence l'augmentation de sa localisation nucléaire de YAP [80].

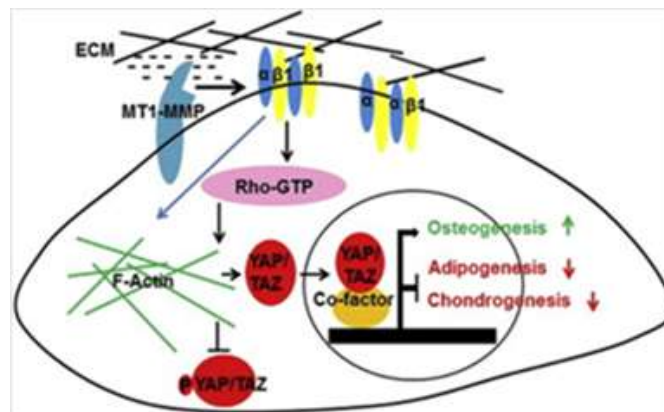


Figure 1.12 : Rôle de MT1-MMP dans la régulation de la localisation nucléaire de YAP/TAZ et le contrôle de la décision cellulaire [78].

1.3.5 Effet du cross talk entre la voie Hippo et autres voies de signalisation

L'homéostasie osseuse est un équilibre entre la formation osseuse par les ostéoblastes dérivés des MSCs et la résorption osseuse par les ostéoclastes dérivés des cellules souches hématopoïétiques (HSCs). Dans des conditions pathologiques, cet équilibre est perturbé. Une activité ostéoclastique élevée ou une faible activité ostéoblastique conduit à une faible masse osseuse (ostéopénie), tandis qu'une faible activité ostéoclastique ou une activité ostéoblastique élevée entraîne une masse osseuse élevée (ostéopétrose). Plusieurs voies de signalisation sont importantes pour maintenir ce délicat équilibre, y compris la voie Hippo, la voie Wnt/ β -caténine, la voie TGF β /BMPs, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie MAPK/ERK.

1.3.5.1 La voie Wnt/ β -caténine

La voie Wnt/ β -caténine est une voie pro-proliférative. En absence du signal Wnt, la quantité de la β -caténine est faible, due à sa phosphorylation par le complexe de destruction: APC (adenomatous polyposis coli)–Axine–GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3 β) et son ubiquitinylation par la β -TrCP ubiquitine ligase d'où sa dégradation protéasome dépendante [81]. Cependant, suite à la liaison de Wnt à un complexe de récepteurs (Frizzled et LRP5/6), le complexe de destruction est déstabilisé ce qui induit une accumulation et une translocation nucléaire de la β -caténine. Dans le noyau, la β -caténine se lie au facteur de transcription TCF/LEF pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine.

Les deux voies Hippo et Wnt interfèrent l'une avec l'autre par l'intermédiaire de leurs effecteurs YAP/TAZ et β -caténine [82] [83]. Plusieurs études montrent que l'activation de la voie Hippo inhibe la voie Wnt. Plusieurs mécanismes d'inhibition ont été décrits (Figure 1.13). En effet, suite à la stimulation par Wnt3A, la caséine kinase 1 δ/ϵ (Ck1 δ/ϵ) recrute et phosphoryle la protéine disheveled (DVL), pour déstabiliser le complexe de destruction APC-Axin-GSK3 β [84]. Valeras et al ont montré que TAZ phosphorylé se lie à DVL ce qui bloque la phosphorylation de DVL par Ck1 δ/ϵ [83]. Une autre étude menée par Zhang et al montre que MST1 bloque la voie Wnt en se liant à Ck1 δ/ϵ ce qui affaiblit l'interaction de DVL avec Ck1 δ/ϵ et inhibe la phosphorylation de DVL. Enfin, YAP/TAZ cytoplasmiques interagissent avec la protéine DVL, ce qui empêche la phosphorylation de DVL par Ck1 δ/ϵ [85]. Finalement, la phosphorylation de YAP/TAZ entraîne leur séquestration dans le cytoplasme ainsi que celle de la β -caténine ce qui bloque la transcription de TEAD (Facteur de transcription de la voie Hippo) et de TCF (Facteur de transcription de la voie Wnt) [84].

D'un point de vue fonctionnel, le cross talk Hippo-Wnt joue un rôle dans le développement osseux. Wnt favorise la différenciation des MSCs en ostéoblastes en stabilisant TAZ [86]. En effet, Wnt3a facilite la déphosphorylation de TAZ par PP1A, ce qui le stabilise, empêche sa liaison à la protéine 14-3-3, induisant ainsi sa localisation nucléaire et donc la différenciation ostéoblastique [87]. Cependant, des résultats contradictoires publiés par Seo et al. ont montré que la liaison de YAP1 à la β -caténine pourrait induire Dkk1 un

régulateur négatif de la voie Wnt et inhiberait l'ostéogenèse dans un processus Sox2 dépendant [70].

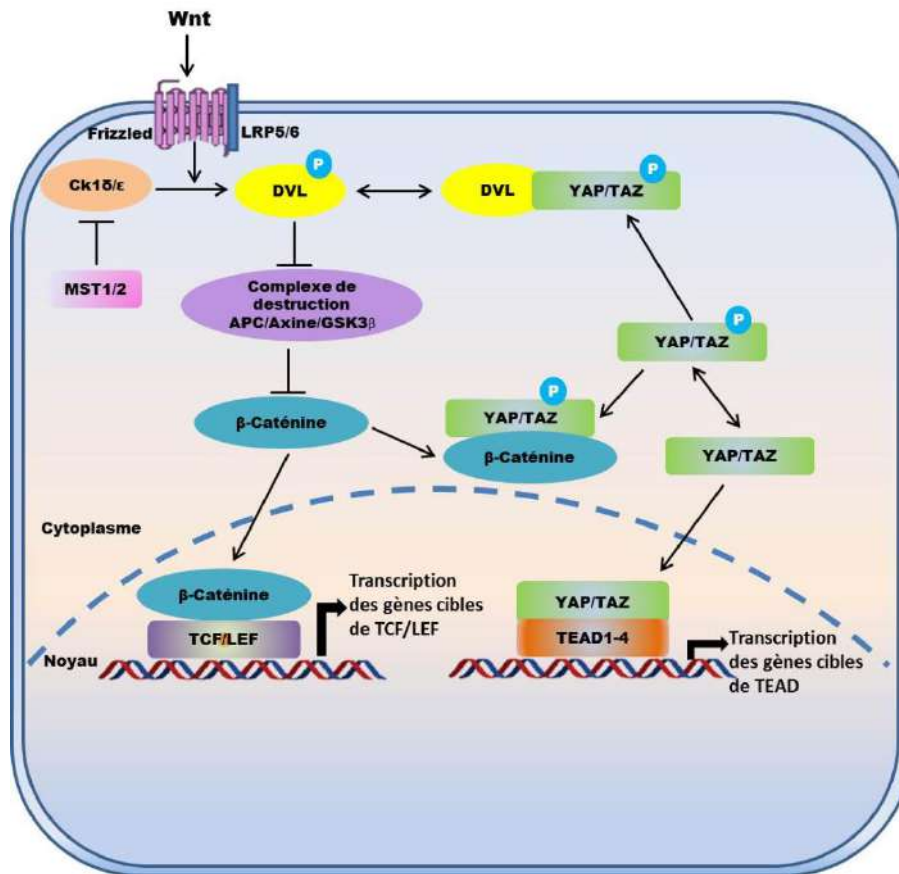


Figure 1.13 : Cross talk entre la voie Hippo et la voie Wnt. Présentation des trois mécanismes d'inhibition de la voie Wnt par la voie Hippo: 1^{er} mécanisme, l'activation de la kinase MST1/2 bloque la voie Wnt. 2^{ème} mécanisme : par inhibition de la phosphorylation de la protéine DVL suite à la phosphorylation de YAP/TAZ. 3^{ème} mécanisme : la phosphorylation de YAP/TAZ entraîne la rétention cytoplasmique de la β -caténine.

1.3.5.2 La voie TGF β /BMPs

La signalisation TGF- β /BMP est médiée par des récepteurs hétéro dimériques à activité sérine/thréonine kinase et des protéines cytoplasmiques appelées Smads. Les membres de la superfamille TGF β sont: les TGF β s (Transforming Growth Factor beta), les activins, les BMPs (Bone Morphogenetic Protein), les GDFs (Growth Differentiation Factor). Le TGF- β se lie à son T β R-II (récepteur de TGF- β de type II) pour stimuler l'activité serine thréonine kinase de T β R-I (récepteur de TGF- β de type I) afin de transmettre des signaux intracellulaires suite à la phosphorylation des R-Smads (receptor-regulated Smads), (Smads

2/3). D'autre part, la protéine BMP se lie à son BMPR (BMP receptor) pour activer R-Smad1/5/8. Les R-Smads phosphorylés formeront des complexes hétéromériques avec Smad4 (co-Smad). Le complexe ainsi formé est alors transloqué dans le noyau pour induire la transcription des gènes cibles. Les signaux médiés par les Smads induits par TGF- β /BMP sont étroitement contrôlés par des mécanismes de rétroaction négative via des Smads inhibiteurs (I-Smads), les Smad6 (principalement pour la signalisation BMP) et Smad7 (principalement pour la signalisation TGF- β)[88].

Plusieurs études ont décrit le cross talk entre la voie Hippo et la voie TGF β /BMPs (Figure 1.14). Dans les cellules souches embryonnaires humaines, TAZ se lie au complexe SMAD2/3-SMAD4 et maintient ainsi ce complexe dans le noyau pour permettant un auto-renouveau des cellules souches. Cependant, la rétention cytoplasmique de TAZ suite à sa phosphorylation empêche l'accumulation nucléaire du complexe SMAD2/3-SMAD4. De plus, un knockdown de TAZ inhibe la voie TGF β et induit une différenciation neuro ectodermique [89]. En outre, Ferrigno et al ont montré que YAP interagit avec SMAD7, ce qui favorise le recrutement de SMAD7 au T β R-I actif et bloque la phosphorylation de SMAD2/3. YAP réprime donc la voie TGF β /SMAD.

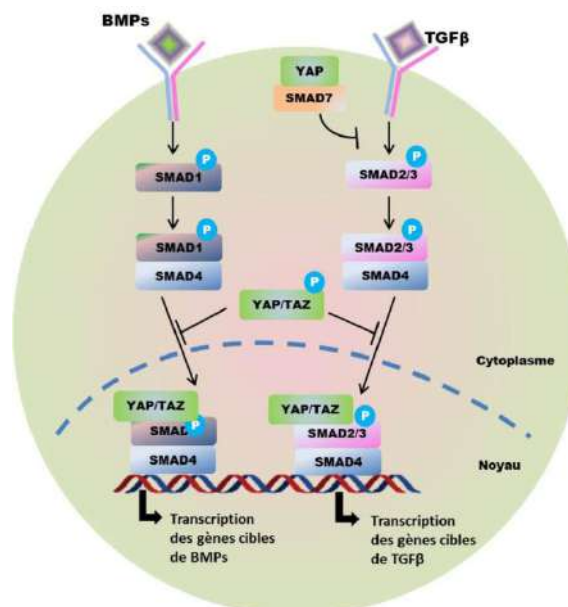


Figure 1.14 : Cross talk entre la voie Hippo et la voie BMPs/TGF β . L'activation de la voie Hippo entraîne la phosphorylation de YAP/TAZ. La phosphorylation de YAP/TAZ bloque la translocation nucléaire des SMADs, ce qui inhibe la transcription des gènes cibles BMPs/TGF β .

D'un point de vue fonctionnel, Varelas et al, ont démontré que la TAZ joue un rôle significatif dans la translocation nucléo-cytoplasmique de Smad dans les cellules souches embryonnaires humaines. L'augmentation de la signalisation du TGF- β en réponse à TAZ semble être spécifiquement associée à une augmentation de la différenciation ostéoblastique [89]. De plus, le traitement des MSCs par BMP2 conduit à une augmentation d'expression de TAZ et à une interaction améliorée avec RUNX2, ce qui favorise la différenciation des ostéoblastes [68]. Ces résultats sont en accord avec les résultats de Zhao et al publiés en 2010 qui ont montré que la stimulation des cellules avec le TGF β 1 augmente l'expression de TAZ au niveau transcriptionnel et traductionnel. L'ensemble de ces mécanismes favorise la différenciation ostéoblastique et réprime la différenciation adipogénique des MSCs [90].

1.3.5.3 La voie PI3K/AKT/mTOR

La détermination de la taille finale de l'organe est obtenue par l'action coordonnée des voies de signalisation impliquées dans la régulation du nombre et de la taille des cellules. Les études au cours de la dernière décennie ont mis en évidence un rôle crucial pour les voies de rapamycine (TOR) et Hippo comme acteurs clés régulant la taille des organes [91] (Figure 1.15). En réponse aux nutriments (acides aminés et nucléotides phosphate) et aux facteurs de croissance, mTOR régule la croissance cellulaire en phosphorylant deux effecteurs: le facteur d'initiation d'eucaryote 4E-binding protein 1 (4E-BP1) et p70-S6 kinase 1 (S6K1) [92] [93]. La voie Hippo contrôle le nombre de cellules par l'inhibition de la prolifération cellulaire.

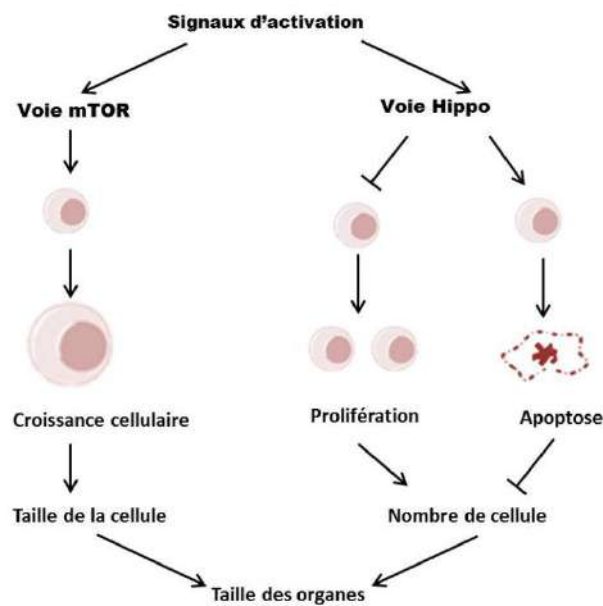


Figure 1.15 : Les voies mTOR et Hippo dans le contrôle de la taille des organes. La voie mTOR régule la taille des organes, en stimulant la croissance cellulaire et augmentant ainsi la taille des cellules. La voie Hippo contrôle la taille des organes en limitant le nombre de cellules par l'intermédiaire de l'inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose.

Des études récentes montrent le cross-talk entre la voie Hippo et la voie mTOR. La surexpression de YKi chez la Drosophile entraîne une augmentation de la phosphorylation de S6K1. En outre, le knockdown de LATS1/2 dans les cellules de mammifères MCF10A entraîne une diminution de la phosphorylation de YAP et active mTORC1/2. Cette dernière est mise en évidence par la phosphorylation d'AKT sur le résidu S473 et de S6K1 sur le résidu T389 qui sont des substrats de mTORC1 et mTORC2, respectivement. En revanche, une augmentation de la phosphorylation de YAP au niveau des cellules à confluences entraîne une diminution de la phosphorylation d'AKT et de S6K1 [94].

Pour fournir un mécanisme moléculaire liant ces deux voies, Tumaneng et al ont étudié la cible en aval de YAP impliquée dans la régulation de mTOR. Cette approche a permis l'identification d'un suppresseur de tumeur : la PTEN (phosphatase and tension homologue) une cible de YAP et qui en détruisant le PIP₃ agit comme un régulateur négatif d'Akt. YAP phosphorylé augmente l'activation de miR-29, un inhibiteur de PTEN (Figure 1.16).

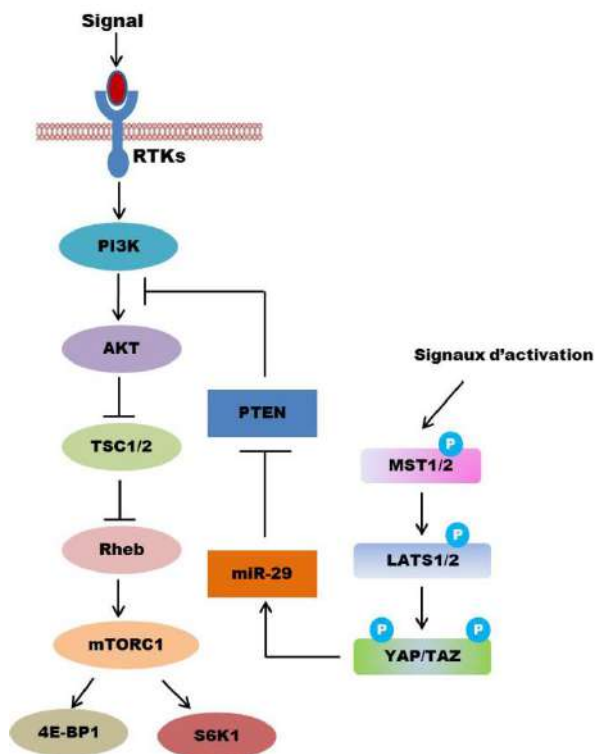


Figure 1.16 : Cross talk entre la voie Hippo et la voie mTOR/PI3K. L'activation de la voie Hippo, inhibe l'effet de PTEN via miR-29. Ce qui induit une activation de la voie PI3K/AKT/mTOR.

Bien que l'interaction Hippo-mTOR ait été bien décrite dans la régulation de la prolifération et de la croissance cellulaire, son rôle dans le développement osseux reste à élucider.

1.3.5.4 La voie MAPK/ERK

La voie MAPK/ERK joue un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire, du développement et de l'apoptose [95]. La voie s'active suite à la liaison du facteur de croissance comme l'EGF (Epidermal Growth factor) à un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK). Ce qui permet l'activation de la protéine Ras qui initialise une cascade de kinase composée des kinases RAF, MEK et MAPK (mitogen-activated protein kinase) qui est aussi nommée la protéine ERK [96].

Plusieurs études montrent qu'ils existent un crosstalk entre la voie MAPK et la voie Hippo (Figure 1.17). Il a été montré que l'inhibition d'ERK1/2 ou de la protéine MEK1/2 diminue la quantité protéique de YAP [97]. De plus, l'activation de Ras entraîne la dissociation de Raf-1-MST2 et stimule l'interaction MST2-RASSF1A (un suppresseur de tumeur) et donc bloque la voie canonique Hippo. Cette action est antagonisée par la kinase AKT [97]. D'autre part, la

dissociation de Raf1-MST2 favorise l'interaction Raf1-MEK ce qui augmente l'activation de MEK-ERK et stimule la prolifération cellulaire. Inversement, la voie MAPK régule la voie Hippo à travers la famille des protéines Ajuba [96]. En effet, l'activation de Ras et de MEK entraîne la phosphorylation et l'activation de WTIP (Wilms Tumor Protein-1-interacting protein) de la famille Ajuba. Suite à son activation, WTIP se lie à WW45 et LATS, ce qui bloque l'activité de LATS et induit une augmentation de l'activité de YAP.

D'un point de vue fonctionnel, la délétion de RASSF2A augmente l'ostéoclastogenèse et réprime l'ostéoblastogenèse. RASSF2A et MST régulent l'homéostasie osseuse dans un mécanisme NF- κ B dépendant [73] [98].

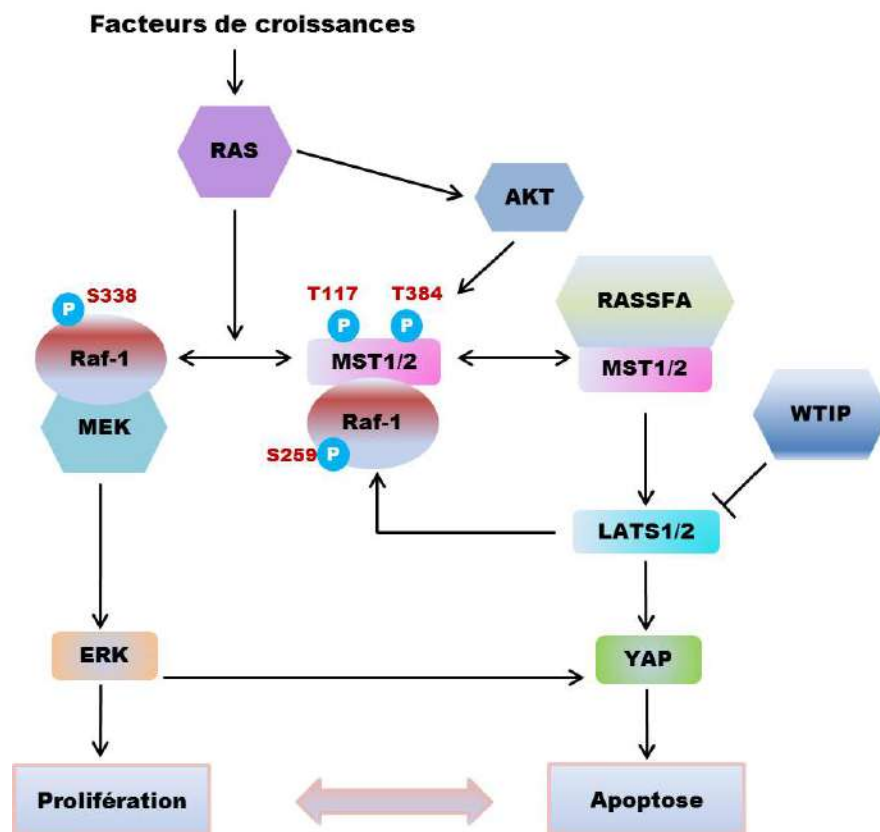


Figure 1.17 : Cross talk entre la voie Hippo et la voie MAPK/ERK. La transition entre Raf-1-MST1/2 et Raf-1-MEK, l'activation d'ERK et l'activation de WTIP régulent la prolifération cellulaire et l'apoptose.

1.3.5.5 Récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)

Récemment, l'identité de divers ligands extracellulaires et de leurs récepteurs régulant la voie Hippo ont été révélées. Yu et al ont montré que la signalisation GPCR peut induire soit une activation soit une inhibition de l'activité de YAP/TAZ en fonction du type de la protéine

G couplée au récepteur [99]. L'activation des récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha 12/13}$, $G_{\alpha q/11}$ et $G_{\alpha i/o}$ induit l'activation de YAP/TAZ. En revanche, l'activation des récepteurs couplés aux protéines $G_{\alpha s}$ inhibe l'activation de YAP/TAZ (Figure 1.18). Par exemple le sérum active rapidement YAP/TAZ grâce à deux composants : l'acide lysophosphatidic (LPA) et la sphingosine 1-phosphate (S1P) [99] [100]. Ces deux travaux montrent que le LPA et la S1P se lient à leurs récepteurs GPCRs et agissent via la protéine Rho A pour activer YAP/TAZ. La thrombine joue également via son récepteur un rôle dans l'activation de YAP/TAZ et augmente l'expression des gènes cibles CTGF et CYR61 [101] [102] [103]. Au contraire, le glucagon, l'adrénaline et la dopamine se lient aux récepteurs couplés à la protéine $G_{\alpha s}$, ce qui induit l'augmentation de la phosphorylation de YAP/TAZ via l'augmentation de la concentration de l'AMPc et l'activation de PKA [99] (Figure 1.18).

En contrôlant l'activation de la voie Hippo, les récepteurs couplés aux protéines G peuvent donc jouer un rôle dans la régulation de la taille des organes, le développement des cancers ainsi que la maintenance des cellules souches. Par exemple, Oury et al ont montré que l'absence d'activation du récepteur couplé à la protéine G_q suite à un knockdown de GPCR6a dans les cellules de Leydig réduit la taille des testicules [104]. D'autre part, des mutations activatrices de la protéine G_q sont fréquemment associées au développement du mélanome uvéal, un cancer rare de l'œil [105]. Cette étude nous laisse penser que la suractivation de YAP induit le développement de ce type de cancer. Cependant, la connexion entre la signalisation GPCRs et les différentes fonctions de la voie Hippo n'est toujours pas claire, et les hypothèses sont encore à confirmer.

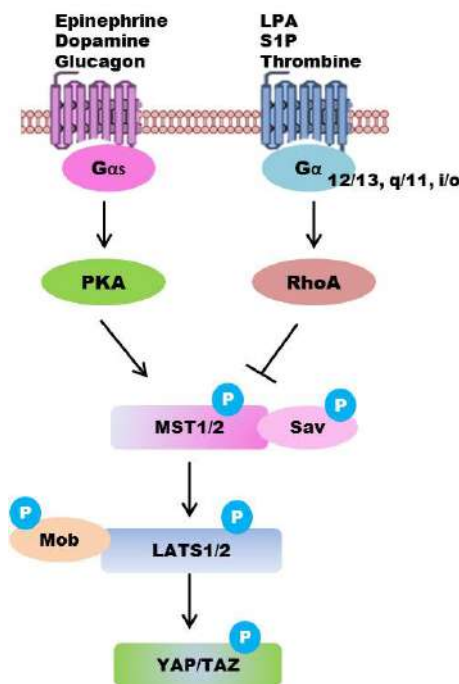


Figure 1.18 : Régulation de la voie Hippo par la signalisation GPCR. La liaison des ligands LPA, S1P et thrombine aux récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{q/11}$ et $G\alpha_{i/o}$ inhibe la voie Hippo. La liaison des ligands Epinéphrine, Dopamine et Glucagon aux récepteurs couplés aux protéines $G\alpha_s$ active la voie Hippo.

1.3.5.6 Le récepteur CD44 et acide hyaluronique

Le récepteur CD44 est un récepteur majeur de l'acide hyaluronique, glycosamino glycane majeur de certaines ECM (comme le cerveau par exemple). C'est une glycoprotéine transmembranaire de type I [106]. Récemment, Zhang et al ont montré qu'un knockout de CD44 diminue l'expression de la quantité totale de la protéine YAP et sa localisation nucléaire dans les cellules A549 et HepG2. Dans ce cas, CD44 agit via Rho A pour réguler l'expression de YAP [104]. Cependant, une autre étude a montré que la liaison de l'acide hyaluronique sur son récepteur CD44 réduit l'expression de VE-cadhérine ce qui est corrélé avec une augmentation de la localisation nucléaire de YAP et donc une inactivation de la voie Hippo [108]. Plus tard, Madri et al ont obtenu les mêmes résultats suite au knockout de CD44 dans les cellules endothéliales [104]. Ces données contradictoires peuvent être dues à une expression de différents isoformes de CD44 dans les différentes lignées cellulaires utilisées et spécifique d'acides hyaluroniques de taille variable.

1.3.6 Régulation de la voie Hippo chez les Mammifères

1.3.6.1 L'inhibition de contact

La densité cellulaire est l'un des premiers signaux physiques découverts, qui régulent l'activité de YAP et TAZ. Lorsque les cellules sontensemencées à une faible densité cellulaire, LATS1/2 sont inactifs, YAP et TAZ s'accumulent dans le noyau et activent la transcription de leurs gènes cibles via les facteurs de transcription TEAD. En revanche, LATS est activée lorsque les cellules sont cultivées à une densité cellulaire élevée [61] et YAP et TAZ sont phosphorylés et ségrégués dans le noyau. La confluence cellulaire favorise les jonctions serrées et les jonctions d'adhérences ce qui active la voie Hippo [61].

Les jonctions d'adhérences sont les jonctions universelles trouvées dans la plupart des types cellulaires. D'autres structures plus spécialisées sont observées dans des types cellulaires plus restreints comme par exemple les cellules épithéliales, où en plus de jonctions adhérentes, on trouve les jonctions serrées, et les desmosomes. Les jonctions serrées divisent la membrane plasmique en un domaine apical et un domaine basolatéral, conduisant à l'établissement d'une polarité apico-basale. Plusieurs études menées chez la Drosophile et chez les Mammifères montrent que les jonctions cellulaires régulent la prolifération cellulaire (un processus appelé inhibition de contact) qui passe par l'activation de la voie Hippo.

La protéine neurofibromatosis 2 (NF2) encore appelée merline est une protéine à FERM domaine (F : Four-point-one protein, E : Ezrine, R : Radixine, M : Moesine). Elle forme un complexe avec la protéine Kidney/Brain (KIBRA) au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. Il a été montré que NF2 bloque le développement des cancers en activant la voie Hippo [109] [110]. NF2 est un donc suppresseur de tumeur dont les mutations ont été associées à la neurofibromatose type II. Elle est impliquée dans l'activation des kinases LATS1/2: LATS1/2 sont recrutées au niveau de la membrane plasmique par NF2 où elle sont activées par MST1/2 [111]. De plus, une autre étude montre que NF2 inhibe également la E3 ubiquitine ligase CRL4^{DCAF1} qui joue un rôle dans l'ubiquitinylation de LATS1/2 dans le noyau [112]. L'ubiquitinylation de LATS1 par CRL4^{DCAF1} entraîne sa dégradation par le protéasome, tandis que celle de LATS2 par CRL4^{DCAF1} induit

une perte de son activité kinase due à un changement de sa conformation. Dans les deux cas, ces processus aboutissent à une augmentation d'activation de YAP/TAZ (Figure 1.19).

Un autre partenaire joue un rôle important dans l'inhibition de contact: les protéines AMOT. Cette famille de protéines inclue AMOT, AMOTL1 et AMOTL2. Elles interagissent avec plusieurs composants des jonctions serrées pour maintenir leur intégrité et donc la polarité des cellules épithéliales [113]. Récemment, l'interaction entre AMOT et YAP/TAZ a été identifiée. L'interaction AMOT-YAP/TAZ est indépendante de la phosphorylation de YAP/TAZ et se fait entre le motif PPxY en N terminal d'AMOT et les domaines WW de YAP/TAZ [114] [115] [116]. Les protéines AMOT jouent un rôle dans le recrutement de YAP/TAZ au niveau des jonctions serrées ou bien au niveau du cytosquelette d'actine et participent donc à leur ségrégation dans le cytoplasme et donc à la diminution de leur activité transcriptionnelle.

En outre, l'interaction NF2/AMOT entraîne l'activation de la voie Hippo [111] [117]. En effet, il a été montré que NF2 peut être présent sous une conformation inactive fermée due à une interaction intramoléculaire tête/queue ou active ouverte. La phosphorylation de NF2 au niveau de la sérine S518 favorise la conformation fermée bien que n'appartenant pas aux domaines d'auto-inhibition. Sous sa forme non phosphorylée, NF2 interagit avec AMOT, ce qui permet l'ouverture de la protéine, le domaine FERM libéré peut alors interagir avec LATS, ce qui favorise son activation et donc la phosphorylation de YAP. La voie Hippo est ON. Ce mécanisme induit un feedback positif. En effet, l'activation de LATS entraîne la phosphorylation d'AMOT. Sous sa forme phosphorylée, AMOT n'interagit plus avec l'actine ce qui favorise l'interaction LATS-NF2 [118] [119] (Figure 1.19).

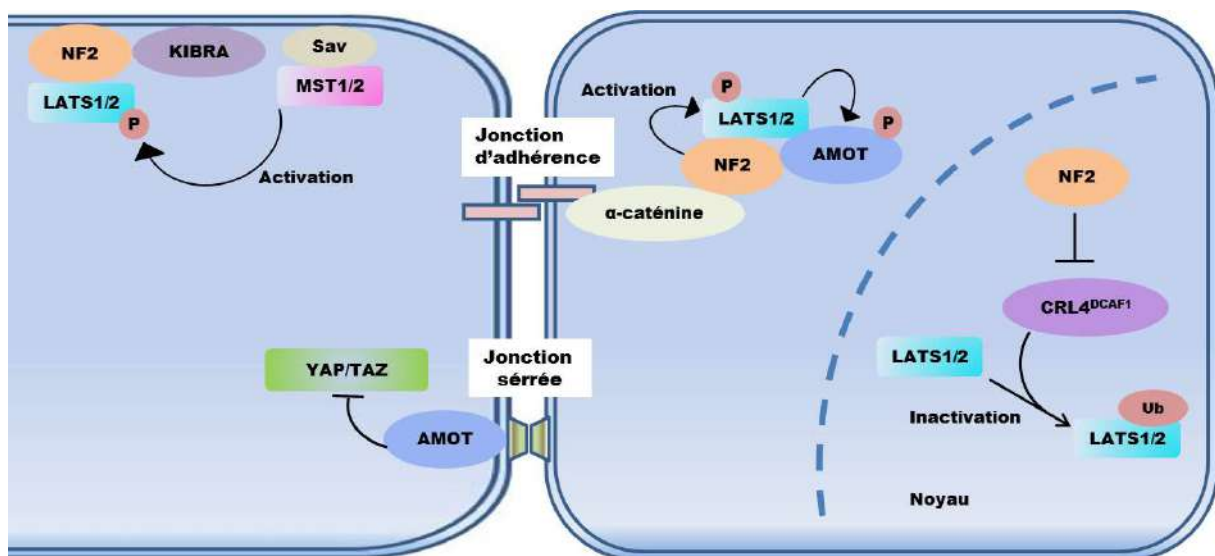


Figure 1.19 : Rôle des protéines NF2 et AMOT dans la régulation de la voie Hippo. NF2 forme un complexe avec la protéine Kibra ce qui induit le recrutement de LATS1/2 et leur activation par MST1/2. D'autre part, le recrutement de NF2 au niveau des jonctions d'adhérences par l' α -caténine induit l'activation de la voie Hippo. NF2 inhibe également l'E3 ubiquitine ligase CRL4^{DCAF1} qui joue un rôle dans l'ubiquitinylation de LATS1/2 dans le noyau. La protéine Amot joue un rôle dans le recrutement de YAP/TAZ au niveau des jonctions serrées ce qui inhibe leur activité.

1.3.6.2 Stress cellulaire

La fonction la plus connue de YAP/TAZ est de promouvoir la prolifération. Il n'est donc pas surprenant de dire que les signaux de stress régulent l'activité de YAP/TAZ. Comment les signaux de stress tel que le stress énergétique, oxydative et l'hypoxie régulent la voie Hippo est un sujet abordé récemment.

Le stress énergétique tel que la déprivation des cellules en glucose, induit une activation de l'AMP-activated protein kinase (AMPK). L'AMPK est un détecteur de l'énergie cellulaire qui coordonne la prolifération cellulaire avec l'énergie disponible. Il peut inhiber l'activité de YAP par deux mécanismes: indirectement, par une augmentation de la phosphorylation de l'angiomotin Like-1 Protein (AMOTL1) au niveau de la sérine 793, une activation rapide de LATS1/2 ce qui induit une augmentation de phosphorylation de YAP/TAZ [120] et donc une diminution de la prolifération cellulaire. Ou directement, par la phosphorylation de YAP au niveau de la sérine 61 ou au niveau de la sérine 94 [121]. La phosphorylation de YAP au niveau de la sérine 61 génère une diminution d'expression des gènes cibles de la voie Hippo probablement en réprimant son activité [122]. Effectivement, il a été récemment montré

que la sérine 94 de YAP est indispensable pour l'interaction YAP-TEAD [123] [124] (Figure 1.20).

D'autre part, le stress oxydatif influence la survie et l'homéostasie cellulaire. Sous un stress oxydatif, MST1/2 sont activées, ce qui induit l'activation de la GTPase Rac qui est nécessaire à la juxtaposition de la mitochondrie avec les phagosomes et donc une production optimale des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans le phagocyte afin de tuer les agents pathogènes [125]. Expérimentalement le traitement des myocytes ventriculaires de rat néonatal par H₂O₂, augmente l'activation de NF2 (une diminution de la phosphorylation de la sérine 518 est observée) et donc stimule la voie Hippo [126].

Contrairement au stress oxydatif et énergétique, l'hypoxie semble activer YAP/TAZ en inhibant LATS. L'hypoxie active la E3 ubiquitine ligase (SIAH2) qui déstabilise LATS2. Cette diminution d'activation de LATS est associée à une diminution de phosphorylation de YAP et à une augmentation de son accumulation nucléaire [127].

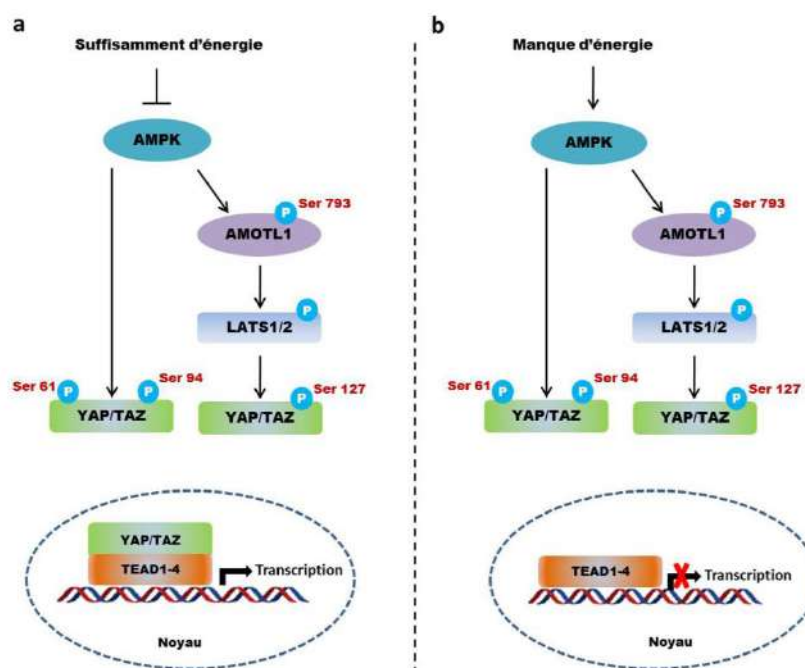


Figure 1.20 : Un modèle de régulation de la voie Hippo par le stress énergétique et l'AMPK. a) Lorsque l'énergie est suffisante, AMPK est inactif et YAP/TAZ est actif, la transcription est ON. b) Lorsque le niveau d'énergie est faible (Stress énergétique), à la fois AMPK et LATS sont actifs ce qui inhibe l'activité de YAP. La transcription est OFF.

1.3.6.3 Rôle du cytosquelette

Comme mentionné plus haut, les cellules *in vivo* sont fréquemment exposées à des signaux physiques et mécaniques provenant du tissu microenvironnement. Les cellules répondent à ces signaux mécaniques en remodelant le cytosquelette d'actine, modifiant leur métabolisme, et en activant divers programmes génétiques conduisant au contrôle de la prolifération, la différenciation cellulaire, et l'apoptose.

Plusieurs travaux ont également montré que YAP et TAZ peuvent être régulés par la mécanotransduction induite par la rigidité de l'ECM et la géométrie des cellules. Lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice rigide, YAP et TAZ sont actifs et s'accumulent dans le noyau, ce qui induit l'expression de leurs gènes cibles, tels que le connective tissue growth factor (CTGF) et l'ankyrin repeat domain 1 (ANKRD1). La délétion de YAP/TAZ inhibe la différenciation ostéogénique des MSCs ensemencées sur une ECM rigide à faible densité (conditions qui favorisent normalement l'ostéogenèse). Inversement, lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice molle, YAP/TAZ deviennent inactifs et sont ségrégués dans le cytoplasme [70]. Comme déjà mentionné, la géométrie des cellules régule également l'activité de YAP/TAZ. Dupont et al. (2011) et Wada et al. (2011) ont démontré que YAP/TAZ sont principalement localisés dans le noyau des cellules bien étalées et plates. En revanche, YAP/TAZ sont localisés dans le cytoplasme des cellules compactes rondes [70] [128].

la localisation de YAP/TAZ en réponse à des signaux mécaniques dépend de la tension du cytosquelette d'actine et l'activité de Rho GTPases [70] [129].

1.3.6.3.1 Intégrité de l'actine et contractilité acto-myosine

La myosine est un moteur moléculaire qui se déplace le long des filaments d'actine et génère des forces contractiles et des tensions dans les cellules. Dupont et al ont montré que les forces de traction sont importantes pour réguler l'activité de YAP/TAZ. [70]. En traitant des cellules cultivées sur un substrat rigide avec de la blébbistatine, un inhibiteur de la myosine II non musculaire qui diminue la tension intracellulaire, on relocalise YAP/TAZ dans le cytoplasme. L'intégrité du cytosquelette d'actine peut également réguler l'activité de YAP/TAZ. Par exemple, le traitement de cellules avec de la Latrunculine A, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine, conduit à une localisation cytoplasmique de YAP/TAZ et à

l'augmentation de la phosphorylation YAP au niveau de la sérine S127 ainsi qu'une diminution de l'expression du gène cible CTGF. Le détachement des cellules inactive YAP et TAZ et déclenche l'anoïkis d'une manière LATS-dépendante [86].

Sur un substrat rigide, RhoA, qui est un activateur majeur de la myosine II non musculaire et de la contractilité de l'actomyosine, régule l'activité de YAP/TAZ. De façon plus générale, l'attachement de cellules à l'ECM induit la localisation nucléaire de YAP via l'activation de Rho-GTPases [129].

1.3.6.3.2 Rôle des microtubules

Les deux réseaux de microtubules et de filaments d'actines sont fortement connectés. En effet, l'actine est capable de conduire les microtubules en périphérie de la cellule et de les stabiliser [130]. De plus, l'adhérence cellulaire favorise le recrutement des microtubules en périphérie de la cellule, où ils sont acétylés et stabilisés dans un processus intégrines dépendant [131]. En 2012, Zhao et al ont montré que les microtubules régulent la phosphorylation de YAP [128]. En effet, un prétraitement des cellules avec le nocodazole (un inhibiteur de la polymérisation des microtubules) maintient YAP dans le noyau suite au détachement des cellules. De même, à une densité cellulaire élevée, le traitement des cellules par le nocodazole induit la déphosphorylation de YAP. Ces résultats montrent que le réseau de microtubules joue un rôle dans la régulation de l'activité de YAP. Par quel mécanisme moléculaire les microtubules régulent la voie Hippo ? Et est-ce que la stabilité des microtubules médiée par les intégrines joue un rôle dans la régulation de la voie Hippo ? Il faut encore plus de recherche dans ce domaine pour répondre à ces questions.

1.3.7 Hippo dans l'ostéosarcome

L'ostéosarcome (OS) est la plus commune des tumeurs primaires osseuses et touche principalement des adolescents. De plus ces tumeurs présentent une forte capacité à métastaser au niveau pulmonaire. Des altérations génétiques et des dérégulations au niveau des voies de signalisation telle que la voie Hippo sont à la base du développement de l'ostéosarcome. Il a été montré que l'expression de YAP1 dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome est plus élevée comparée à celle dans les ostéoblastes humains normaux

[132]. D'autre part, une diminution d'expression des protéines NF2 et KIBRA est observée dans l'OS en comparaison à des ostéoblastes normaux [129]. De même, une délétion de NF2 entraîne le développement d'OS chez les souris. Lee et al ont également observé, que 22% des souris WW45 hétérozygotes développent un ostéosarcome [56].

Le méthotrexate et le doxorubicine sont les médicaments les plus couramment utilisés dans le traitement de l'ostéosarcome et la résistance à ces médicaments diminue le taux de survie des patients. Il a été montré que la chimiorésistance à ces médicaments est due à une augmentation d'activation de la protéine YAP [134].

Comme les intégrines jouent un rôle dans la régulation de la voie Hippo, d'autres groupes ont étudié l'implication des intégrines dans le développement de l'ostéosarcome. Bouvier et al ont montré une augmentation d'expression de l'intégrine $\beta 1$ dans l'ostéosarcome, corrélée avec une augmentation d'expression de YAP, ceci suggère que les intégrines $\beta 1$ en régulant la voie Hippo jouent un rôle dans le développement de l'ostéosarcome [135]. L'utilisation d'inhibiteurs de YAP et de l'intégrine $\beta 1$ pourrait représenter des solutions thérapeutiques nouvelles pour le traitement de l'ostéosarcome.

1.4 Objectifs de la thèse

Comme présenté dans cette introduction plusieurs facteurs régulent la voie Hippo et contrôlent la localisation nucléaire de YAP et par conséquent la prolifération cellulaire. Parmi ces facteurs, on peut compter les signaux mécaniques ressentit par la cellule par l'intermédiaire des récepteurs membranaires tel que les intégrines. Parmi celles-ci les intégrines à chaîne à chaîne $\beta 1$ semblent jouer un rôle prépondérant. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires par lequel les intégrines $\beta 1$ régulent la localisation nucléaire de YAP restent à élucider.

L'objectif de cette thèse a été l'identification du mécanisme par lequel les intégrines $\beta 1$ contrôlent la translocation nucléaire de YAP en utilisant des lignées ostéoblastiques où le gène *Itgb1* encadré par les deux sites loxP a été délété ou non par la recombinaison Cre.

Chapitre 2: Résultats

Dans cette étude, nous apportons une explication mécanistique à la question suivante : Comment les intégrines contrôlent la prolifération cellulaire en régulant l'activation de la voie Hippo ?

2.1 Synthèse des résultats

2.1.1 Les intégrines $\beta 1$ contrôlent la prolifération des ostéoblastes en contrôlant la localisation nucléaire de YAP

Dans le but d'étudier comment les intégrines $\beta 1$ régulent la prolifération des ostéoblastes, nous avons délété les intégrines $\beta 1$ au stade pré-ostéoblastique du développement osseux en utilisant le système Cre-LoxP. Les résultats obtenus par analyse histomorphométrique montrent une diminution de la prolifération cellulaire *in vivo* suite à cette délétion. De plus, les tests de prolifération réalisés *ex vivo* montrent une diminution de la prolifération des ostéoblastes $\beta 1^{-/-}$ (article, Figure 1).

La prolifération cellulaire peut être contrôlée par la voie des MAPK (ERK1/2) ou par la voie Hippo. L'activation constitutive de la voie ERK ne restaure pas de phénotype sauvage dans les cellules $\beta 1^{-/-}$. En revanche l'expression d'un mutant YAP non phosphorylable (YAP^{55A}) permet de retrouver une prolifération normale dans ces cellules. Les résultats obtenus montrent une augmentation de la phosphorylation de YAP dans les ostéoblastes $\beta 1^{-/-}$, corrélée avec une diminution de la localisation nucléaire de YAP et une diminution de l'expression des gènes cibles de la voie Hippo ANKRD1, Cyr 61 et CTGF. De plus, la réexpression de l'intégrine $\beta 1$ restaure la localisation de YAP dans le noyau (article, Figure 2).

D'autres parts, nos expériences montrent clairement que lors de l'étalement cellulaire, YAP se localise transitoirement au niveau de la membrane plasmique avant sa translocation dans le noyau. Nos résultats suggèrent l'existence d'un complexe d'inhibition ternaire LATS/NF2/YAP au niveau des extensions membranaires favorisant la phosphorylation de YAP par LATS, ce qui favorise sa ségrégation dans le cytoplasme (article, Figure 3).

2.1.2 Les intégrines $\beta 1$ contrôlent la localisation nucléaire de YAP en modulant l'activation de PAK/NF2

Dans le but de vérifier l'existence du complexe LATS/YAP/NF2 au niveau de la membrane plasmique, nous avons testé si l'intégrine $\beta 1$ contrôle la translocation nucléaire de YAP d'une manière NF2 dépendante. Pour cela nous avons utilisé le mutant dominant négatif NF2^{BB} qui n'interagit pas avec LATS. La surexpression de ce mutant dans les cellules $\beta 1^{-/-}$ restaure la prolifération de ces cellules, diminue la phosphorylation de YAP et augmente sa localisation nucléaire. Outre l'interaction membranaire de NF2/LATS est déjà connue, nous avons montré que les intégrines $\beta 1$ contrôlent l'interaction NF2/YAP au niveau membranaire. En effet cette interaction augmente suite à la délétion des intégrines $\beta 1$ (article, Figure 4). Finalement, nous avons démontré que l'activité de PAK (la kinase inhibitrice de NF2) est diminuée dans les cellules $\beta 1^{-/-}$ et que l'interaction NF2/YAP est inhibée par l'activité de la kinase PAK (article, Figure 5).

2.1.3 L'intégrine $\beta 1$ contrôlent la localisation nucléaire de YAP en modulant la localisation de Rac1

Il est déjà décrit dans la littérature que l'activité de YAP est régulée par la famille des protéines Rho GTPases, qui sont des cibles importantes dans la signalisation des intégrines. Parmi les Rho GTPases, Rac1 et dans une moindre efficacité cdc42 jouent un rôle dans la localisation nucléaire de YAP dans notre système biologique, tandis que RhoA n'a aucun effet. Une surexpression de la forme constitutivement active de Rac1 dans les cellules $\beta 1^{-/-}$ restaure la prolifération de ces cellules, diminue la phosphorylation de YAP ainsi qu'une augmentation de l'activation de PAK (article, Figure 6).

2.1.4 Les intégrines $\beta 1$ contrôlent la localisation membranaire de Rac1 via les vésicules DRM

Ayant mesuré que l'activation de Rac1 n'est pas affectée suite à la délétion des intégrines $\beta 1$, nous nous sommes demandé si la diminution d'activation de PAK dans ces cellules était due à une localisation anormale de Rac1. En effet par immunofluorescence, nous avons montré une diminution de la localisation de Rac1 en périphérie membranaire des cellules $\beta 1^{-/-}$

^{1/}. Rac1 comme la plupart des protéines de la famille Rho sont des substrats de la géranylgeranyl transférase I. L'association du groupement géranylgeranyl permet l'association de Rac1 aux membranes DRM (Detergent resistant membranes). Par immunofluorescence, nous avons montré qu'il existe des changements de distribution des vésicules DRM (suivies par un marquage p18/LAMTOR) en périphérie des cellules $\beta 1$ délétées. On a également observé que Rac1 est co-localisé avec les vésicules p18/LAMTOR. Finalement, par immunoprécipitation, nous avons démontré une interaction p18-Rac1 qui diminue suite à la délétion des intégrines $\beta 1$. Donc Rac1 retourne en périphérie membranaire via les vésicules p18/LAMTOR positives. Ce trafic vésiculaire est intégrine $\beta 1$ dépendant (article, Figure 7).

2.1.5 Les intégrines $\beta 1$ stabilisent les microtubules pour induire une localisation membranaire de Rac1 via le trafic des vésicules p18/LAMTOR

Il a été décrit dans la littérature que l'adhérence cellulaire favorise le recrutement des microtubules en périphérie de la cellule, où ils sont acétylés et stabilisés dans un processus dépendant des intégrines. Dans les ostéoblastes déficients en intégrines $\beta 1$ par immunofluorescence, nous avons montré un défaut de ciblage des microtubules en périphérie membranaire. Par Western blot, nous avons également mis en évidence une diminution d'acétylation des microtubules suite à la délétion des intégrines $\beta 1$ suggérant une diminution de leur stabilité. Effectivement, suite à la stabilisation des microtubules après traitement des cellules à la TSA (un inhibiteur des déacétylases), une redistribution normale des vésicules p18/LAMTOR positives est observée sur lesquelles est co-localisé Rac1. Le ciblage de microtubules stables à la membrane joue donc un rôle dans le retour des vésicules DRM en périphérie membranaire et donc dans la translocation de Rac1 à la membrane plasmique (article, Figure 8).

2.1.6 Le ciblage des microtubules par les intégrines $\beta 1$ contrôle la translocation nucléaire de YAP

Nous avons voulu étudier si le défaut de ciblage des microtubules et du transport vésiculaire sont à l'origine du défaut de la translocation nucléaire de YAP dans les cellules $\beta 1^{-/-}$. Nous avons montré qu'il y a une augmentation de la phosphorylation de LATS et de YAP dans les cellules $\beta 1^{f/f}$ suite aux traitements avec la primaquine (un inhibiteur de l'exocytose), corrélés avec une diminution de la localisation nucléaire de YAP. Cette diminution de la localisation nucléaire est également observée suite au traitement des cellules avec le nocodazole (un inhibiteur de la polymérisation des microtubules). La surexpression du mutant Rac1^{G12V} (une forme activée de Rac1) rend les cellules insensibles au nocodazole indiquant que Rac1 agit en aval des microtubules dans le mécanisme d'activation de YAP (article, Figure 9).

2.2 Conclusion

Ces travaux fournissent un aperçu intéressant à la fois du mécanisme de la localisation et de la signalisation Rac1 médiées par l'intégrine $\beta 1$, et les mécanismes d'activation de YAP médiée par l'adhésion. Nous avons montré que le transport de Rac1 au niveau de la membrane plasmique se fait via les vésicules DRM (suivi par un marquage p18/LAMTOR), et nécessite le réseau des microtubules. Au niveau de la membrane, Rac1 active PAK. PAK activé stimule la dissociation du complexe NF2/YAP. Ceci induit une inhibition de la voie Hippo. YAP est transloqué dans le noyau et stimule la prolifération des cellules ostéoblastiques.

2.3 Article

β 1 integrin dependent Rac vesicular trafficking mediates PAK/NF2 signaling to induce YAP activation.

Running title:

Control of YAP activation by cell adhesion

Hiba Sabra^{1,2,3*}, Molly Brunner^{1,2,3*}, Anne-Sophie Ribba^{1,2,3}, Vinay Mandati⁴, Edwige Belotti^{1,2,3}, Noémie Mandier^{1,2,3}, Genevieve Chevalier^{1,2,3}, Bernhard Wehrle-Haller⁶, Corinne Bouvier⁷, Dominique Lallemand⁵, Philippe Guardiola⁸, Marc R. Block^{1,2,3} and Daniel Bouvard^{1,2,3#}.

- 1: INSERM U1209, Institute for Advanced Bioscience, Grenoble, France
- 2: CNRS 5309, Institute for Advanced Bioscience, Grenoble, France
- 3: Univ. Grenoble Alpes, Institute for Advanced Bioscience, Grenoble, France
- 4: Department of Cancer Biology, The Scripps Research Institute, Jupiter, Florida, USA
- 5: CNRS 7654, Ecole Polytechnique, Dept of Biochemistry, Palaiseau, France
- 6: Dept. of Cell Physiology and Metabolism, Centre Médical Universitaire, University of Geneva, Geneva, Switzerland
- 7: Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital La Timone, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France
- 8: Centre Hospitalier Universitaire and University of Angers, SNP Platform, Institute for Biological Health, Transcriptome and Epigenomic, Angers, France

* Equal contributions

To whom correspondence should be addressed:

Daniel Bouvard
Institute for Advanced Bioscience, Univ. Grenoble Alpes, Site Santé, BP170 La Tronche
38042 Grenoble cedex 9 France
Tel : +33 476549551
Fax : +33 476549425

Email: daniel.bouvard@univ-grenoble-alpes.fr

Abstract

Hippo signaling, via the regulation of the co-transcription factors YAP and TAZ, has emerged as an important pathway in the control of adhesion dependent cell proliferation. However, at the molecular level, how cells integrate extracellular information to regulate YAP nuclear localization is still puzzling. Herein, we addressed the role of $\beta 1$ integrins in regulating this process. We showed that the reduced proliferation upon $\beta 1$ loss was due to a defect in the recycling of detergent resistant membranes (DRM) containing vesicles to the plasma membrane. DRM and p18/Lamtor positive vesicles transport via a stabilized microtubule network allows Rac targeting to plasma membrane extensions. $\beta 1$ dependent Rac localization controls PAK activation to reduce the interaction between merlin and YAP and thereby the vicinity between the latter and LATS resulting in YAP dephosphorylation/activation. Our data highlight Rac as a key player regulating both lamellipodial activity and YAP nuclear translocation linking cell proliferation and actin dependent processes such as cell migration and invasion.

Introduction

Cell adhesion to the extracellular matrix or to surrounding cells plays a key role in cell proliferation, differentiation or apoptosis, and consequently is critical for proper development or tissue homeostasis (Hynes, 1992). On the other hand, deregulation of this process often contributes to pathological disorders such as tumor formation, growth and metastasis (Bouvard et al., 2013), exemplified by one of the hallmarks of cell transformation: the anchorage-independent growth (Assoian and Schwartz, 2001; Hirsch et al., 2002).

The Hippo signaling has been identified as an important regulatory pathway that restricts cell proliferation, thereby controls organ size and morphogenesis (Harvey et al., 2003; Zhao et al., 2011). This is achieved mainly through the control of two transcriptional co-activators: Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ/WWTR1). Upon restrictive proliferative conditions, these molecules are phosphorylated by the products of the large tumor suppressor gene 1 and 2 (LATS1/2), thereby creating a binding site for 14-3-3 proteins (Pan, 2010) which binding prevents their nuclear import. As a consequence, phosphorylated forms of YAP/TAZ are sequestered in the cytoplasm (Kanai et al., 2000; Schlegelmilch et al., 2011).

While originally described as the main switch to block cell proliferation when confluency is reached, it has become clear that the hippo signaling pathway is integrating several inputs such as cell density, cell geometry, matrix stiffness, metabolic status and serum composition (Meng et al., 2016). Indeed, activation of YAP/TAZ mediated transcriptions, which correlates with their nuclear localization, are tightly controlled by cell matrix adhesion (Kim and Gumbiner, 2015; Zhao et al., 2012). This process explains why cells are dependent on matrix adhesion for a full mitogenic response to growth factors exposure (Huang and Ingber, 2005). Loss of cell adhesion to the ECM is known to induce an increase in cyclic AMP (cAMP)

which is correlated with the inhibition of mitogenic signaling (Howe and Juliano, 2000). Since YAP/TAZ activities are also inhibited by cAMP, this raise in cAMP was proposed as the main factor to regulate YAP/TAZ upon cell detachment, potentially mediated through downstream players such as Rho A or LATS (Kim et al., 2013; Zhao et al., 2012). Despite these findings, the molecular mechanism by which cells recognize and transduce the physical properties of the cellular micro-environment, notably via integrin-mediated signaling to control subcellular YAP/TAZ localization remains ill-defined and has never been directly investigated.

Herein, we address the mechanistic role of β 1 integrins in the regulation of YAP localization and thereby cell proliferation. We found that β 1 integrin-dependent cell adhesion was critical for supporting cell proliferation in mesenchymal cells both *in vivo* and *in vitro*. This restriction relies on the relocation of YAP in the cytoplasm after the upregulation of its phosphorylated state mediated by LATS1/2. Mechanistically, we showed that β 1 integrins orchestrated the local delivery of the small GTPase Rac1 to plasma membrane extensions via the organization of a stabilized microtubule network. At the plasma membrane, Rac1 by activating its effector PAK initiated in a merlin dependent manner the nuclear translocation of YAP. Indeed, we found that merlin (a known binding partner and activator of LATS) also interacted with YAP and that PAK negatively regulated this interaction. Altogether our data revealed a novel signaling pathway orchestrated by β 1 integrins via microtubules to locally activate a Rac/PAK cascade that negatively regulated merlin/YAP interaction and LATS dependent phosphorylation.

Results

β 1 integrins regulate osteoblasts cell proliferation *in vivo* and *in vitro*.

To explore the function of β 1 integrins in bone tissue, we inactivated the β 1 integrin gene in osteoblasts using Osterix-driven Cre recombinase expression. Mice with an osteoblast specific β 1-integrin deletion survived to adulthood but suffered from a growth deficit along with a significant decrease in the absolute number of osteoblasts (Fig. 1A). In line with these observations, the commitment of mesenchymal stem cells to osteoblasts was strongly reduced after the loss of β 1 integrins (Fig. 1B, 1C). While TUNEL staining did not reveal any significant difference in apoptotic cell number (Fig. 1D, 1E), a significant reduction in BrdU incorporation was observed in mutant animals (Fig. 1F, 1G). Similarly, the loss of β 1 integrins in mesenchymal cells, such as mouse embryonic fibroblasts (MEFs; Fig. S1A) or osteoblasts, resulted in a significant proliferation defect (Fig. 1H). Although it has been proposed that integrins are important regulators of ERK signaling (Zhu and Assoian, 1995), we could not rescue the proliferation defect of β 1 integrin deficient cells by activating the MAPK/ERK pathway (Fig. S1B). In addition, we did not detect any significant modification of ERK phosphorylation when β 1 integrin deficient cells were compared to wild-type cells (Fig. S1C).

β 1 integrins are required for YAP nuclear localization and cell proliferation.

On the search of an alternative pathway, we focused our attention on YAP signaling since it has emerged as an important oncogenic pathway that was described to be regulated by cell adhesion (Zhao et al., 2012). In sharp contrast to wild-type cells that displayed a prominent YAP/TAZ nuclear localization, these proteins were retained into the cytoplasm of β 1 integrin

deficient cells (Fig. 2A, 2B). This observation was confirmed in other clones analyzed (Fig. S2A), as well as in cell lines stably expressing a flag tagged YAP (Fig. S2B). To further evaluate the involvement of ERK/MAPK pathway in controlling YAP nuclear localization downstream of $\beta 1$ integrins, we isolated MEF cells from mouse bearing a constitutively active allele of K-Ras (K-Ras^{G12D}) (Jackson et al., 2001) with one or two deleted alleles of the $\beta 1$ integrin gene. Even in the presence of the activated allele of K-Ras, YAP was mainly cytoplasmic as soon as the $\beta 1$ integrin chain was genetically ablated (Fig. S2C). Importantly, YAP/TAZ nuclear localization was completely restored upon the re-expression of the human $\beta 1$ integrin subunit in $\beta 1$ deficient mouse cells showing a direct relationship between $\beta 1$ expression and the nuclear localization of YAP/TAZ (Fig. 2A, 2B). In line with these observations, biochemical fractionations revealed a decrease in the nuclear pool of YAP in $\beta 1$ deficient cells (Fig. S2E). Along with the reduced level of nuclear YAP, the expression of its target genes was also downregulated in $\beta 1$ deficient cells (Fig. 2C). As $\beta 1$ integrins are known to integrate both adhesive and mechanical signals from the extracellular matrix, we analyzed the kinetic of YAP nuclear translocation during cell spreading on fibronectin. We observed a time dependent accumulation of YAP in the nucleus that reached a plateau after two hours of spreading (Fig. S2D), these experiments confirmed that cell-matrix adhesion plays a pivotal role in YAP nuclear translocation. YAP is sequestered in the cytoplasm by 14-3-3 proteins after the activation of its upstream protein kinase LATS (Kanai et al., 2000). In good agreement with this, we noticed that the phosphorylation of YAP on S127 (required for 14-3-3 binding) increased upon deletion of $\beta 1$ integrin as well as the activated (phosphorylated) form of LATS (Fig. 2D). Accordingly, mutation of all five LATS1/2 phosphorylation sites of YAP (YAP^{5SA}) restored both its nuclear accumulation in $\beta 1$ integrin null cells (Fig. 2E and S2F) and the expression of YAP target genes (Fig. S2G, S2H). Finally,

by measuring BrdU incorporation to quantify cell proliferation, we found that the expression of YAP^{5SA} was able to restore $\beta 1^{-/-}$ cell proliferation capabilities (Fig. 2F).

Next, we performed unbiased transcriptomic analyses on wild-type and $\beta 1$ integrin deficient cells under optimal growth conditions. With the defined filtering and statistical criterion, 800 probes representing 555 well annotated genes were identified as being differentially expressed between the 2 considered groups (Fig. S3). Known YAP/TEAD target genes were significantly down-regulated in $\beta 1^{-/-}$ cells. Among those were ANKRD1, CTGF, and CYR61 (Fig. S4). These results were confirmed by RT-qPCR analyses (Fig. 2C, S2G). Consistent with the above-mentioned proliferation defect, a number of cell cycle regulators were also deregulated (Fig. S2H, S3). To directly estimate whether the YAP/TEAD complex might impact the expression of those important cell cycle regulators we analyzed p19^{Arf}, p21^{CIP} and cyclin D2 expression by RT-qPCR in cell expressing YAP^{5SA}. In contrast to what was measured in $\beta 1$ deficient cells, the expression of YAP^{5SA} in wild-type cells was able to upregulated cyclin D2 and downregulated p19^{Arf} but not p21^{CIP} when compared to control cells (Fig. S2H). This strongly suggests that some important cell cycle regulators are transcriptionally modified by the YAP/TEAD complex.

YAP transiently localize in membrane ruffles during cell spreading.

After overnight spreading on fibronectin, YAP strongly localized in the nucleus of control cells. However, in $\beta 1$ integrin deficient cells YAP was mostly absent from the nucleus but accumulated in a perinuclear compartment and in patches at the plasma membrane (Fig. 3A arrows). Next, we used confocal microscopy to better characterize the spatiotemporal localization of YAP during cell spreading on fibronectin. In control cells, we observed a transient localization of YAP within patches at the cell membrane whereas this localization

persisted in $\beta 1$ deficient cells (Fig. 3B). Interestingly, in wild-type cells, those patches corresponded to regions of high protrusive activity (ruffles) that were positive for the actin regulator cortactin (Fig. 3C). This spatiotemporal localization of YAP suggested a dynamic and also cell adhesion dependent regulation mechanism, YAP being concentrated in ruffles prior to its translocation into the nucleus (Fig. 3B, S2D). Therefore, we asked whether this localization at the plasma membrane corresponded to the formation of an inhibitory complex. Double immuno-labeling of YAP with YAP^{pS127}, or with its major negative regulators LATS1/2 and NF2/merlin were carried out. Using fluorescence intensity correlation analysis to quantify colocalizations (Li et al., 2004), we found that YAP and YAP^{pS127} significantly colocalized with LATS1 and NF2/merlin at cell edges (Fig. 3D). Cell fractionation and membrane isolation by differential centrifugation (15,000 g and 120,000 g, containing plasma membrane enriched with endosomes (PE) or with endo-lysosomes (EL), respectively) confirmed that YAP^{pS127}, LATS, LATS^{pS909} were all detected in the plasma membrane/endosome enriched fraction (PE) in both wild-type and $\beta 1$ deficient cells (Fig 3E). Immunoblotting of NF2/merlin revealed two bands corresponding to the phosphorylated and non-phosphorylated protein, respectively (Shaw et al., 2001). The latter was preferentially detected in the plasma membrane/endosome enriched fraction (Fig. 3E) in good agreement with the presence of the activated (phosphorylated) form of LATS as previously shown (Yin et al., 2013). To further test whether the membrane associated YAP was modulated by LATS, we treated the cells with forskolin to increase cAMP levels intended to promote LATS activation (Kim et al., 2013). The drug induced an about two-fold increase in the phosphorylated and membrane associated pool of YAP (Fig. 3F). A similar increase in the recruitment of YAP^{pS127} to the membrane fraction was reproducibly observed upon the removal of $\beta 1$ integrins (Fig. 3F).

β 1 integrin negatively controls YAP/merlin interaction and induces YAP nuclear translocation.

Having shown that YAP transiently localized with LATS and merlin at the plasma membrane during spreading, and knowing the important role of merlin in activating LATS and thereby YAP localization, we wondered whether β 1 integrins controlled YAP nuclear translocation in a merlin dependent manner. To address this, we used a dominant negative form of merlin (NF2^{BB} mutant) that is recruited to membranes but do not interact with LATS ((Li et al., 2015), Fig. S5A). The expression of NF2^{BB} did not affect YAP nuclear localization in β 1^{ff} cells, however in β 1^{-/-} cells it induced a strong YAP nuclear translocation (Fig.4A, 4B). Supporting these results, expressing NF2^{BB} mutant in β 1 deficient cells reduced YAP phosphorylation (Fig. 4C), restored cell proliferation (Fig. 4D) and YAP target genes (Fig. 4E). Taken together these data with previous coimmunostaining results (Fig. 3D), strongly supported the hypothesis that β 1 integrins regulated YAP nuclear translocation by controlling its phosphorylation state in a merlin dependent manner, for instance, by recruiting YAP and merlin within a same functional complex. To investigate this, we separated the total membranes from the cytoplasm and then immunoprecipitated YAP in each fraction. A specific interaction between YAP and merlin was detected only in the membrane fraction, and this interaction appeared to be more robust when β 1 integrin gene was deleted (Fig. 4F). Altogether, these data were consistent with the role of β 1 integrins in the negative regulation of YAP and merlin interaction in a membrane associated complex.

PAK, a merlin inhibitor, is regulated by β 1 integrins

Phosphorylation of the C-terminal tail of merlin was reported to modulate its interaction with both Amot (a YAP binding partner) and LATS (Yin et al., 2013),(Li et al., 2015). So far, two protein kinases were shown to be involved in this regulation: PKA and PAK (Alfthan et al., 2004; Okada et al., 2005). However, PKA stimulates LATS kinase activity and subsequently YAP phosphorylation ((Kim et al., 2013; Yu et al., 2013), Fig. 3F). Therefore, this protein kinase is unlikely involved in the regulation of merlin head to tail interaction that would result in a decrease in LATS membrane recruitment and activity (Yin et al., 2013),(Li et al., 2015). Consequently, PAK appeared a better candidate in this regulation. Indeed, PAK activity was reduced in $\beta 1$ deficient cells but restored upon the re-expression of $\beta 1$ integrins (Fig. 5A). Knowing that PAK activation occurs at the plasma membrane (Parrini et al., 2009; Sells et al., 2000), we addressed whether membrane targeting of PAK was also affected by the removal of $\beta 1$ integrins. Indeed, compared to control cells, the lack of $\beta 1$ integrin expression reduced PAK localization at the membrane (Fig. 5B). In $\beta 1$ deficient cells, the decrease in PAK membrane localization was rescued by the expression of the constitutively active Rac1^{G12V} (a well characterized PAK activator) (Fig 5B). In addition, the transient expression of the constitutively active form of PAK^{T423E} induced YAP nuclear translocation in $\beta 1$ deficient cells (Fig. 5C). As mentioned above, PAK is a potential kinase that phosphorylates merlin to modulate LATS and Amot recruitment (Li et al., 2015). Therefore, we wondered whether the YAP/merlin interaction was also modulated by PAK. Indeed, in the membrane fraction, merlin/YAP interaction was reinforced upon PAK inhibition by its inhibitor IPA3 (Fig. 5D). Finally, if our assumption were correct, the inhibition of PAK activity would block YAP nuclear translocation in a merlin dependent manner. Hence, we analyzed YAP subcellular localization in IPA3-treated $\beta^{f/f}$ cells expressing or not the NF2^{BB} mutant. As expected, the inhibition of PAK significantly reduced YAP nuclear localization in control cells while it had

no significant effect in NF2^{BB} expressing cells, indicating that PAK was involved in YAP nuclear translocation upstream of merlin (Fig. 5E, 5F).

Altogether, these results strongly supported a picture in which β 1 integrin dependent activation of PAK modulates YAP nuclear translocation by weakening its interaction with merlin.

Rac1, but not RhoA, controls YAP nuclear localization downstream of β 1 integrins but upstream of merlin

It was recently shown that members of the Rho GTPase family are involved in the control of YAP activity (Feng et al., 2014; Reginensi et al., 2013; Zhao et al., 2012). Integrins are important regulators of small GTPases such as RhoA, Rac1, or Cdc42 (Gimond et al., 1999; Hirsch et al., 2002). To address the putative involvement of small GTPases in YAP nuclear localization during cell spreading, we treated cells with the geranyl-geranyl transferase inhibitor GGTI (Joyce and Cox, 2003) and immuno-stained control cells for YAP. Blocking small GTPases recruitment to cholesterol rich membranes blocked YAP nuclear localization (Fig. S5B and S5C). These results indicated that small GTPases were also involved in YAP nuclear localization in our biological system. Next, we wondered which of the small GTPases controlled YAP nuclear translocation downstream of β 1 integrins. We generated β 1 deficient cells expressing constitutively activated forms of RhoA, Rac1, and Cdc42, respectively, and analyzed YAP subcellular localization. In β 1 deficient cells, RhoA was unable to restore the nuclear localization of YAP (Fig. 6A, 6B, S5D). In sharp contrast, Rac1^{G12V} expression (and to a lower extent Cdc42^{G12V}, Fig. S5E) were associated with a significant increase in YAP nuclear localization in β 1^{-/-} cells, although cell spreading was not affected (Fig. 6A, 6C, S5I). This strongly suggested that β 1 integrin dependent cell adhesion was required for modulating Rac1 signaling upstream of YAP nuclear localization. In line with this observation, upon β 1

integrin loss we neither observed any significant difference in RhoA-GTP nor a modified distribution (Fig. S5F, S5G). Conversely, the expression of Rac1^{G12V} in β 1 deficient cells reduced YAP phosphorylation to a level identical to the one detected in control cells together with an expected activation of its effector PAK (Fig. 6D). Consistent with the reduced phosphorylation of YAP, Rac1^{G12V} expression in β 1 deficient cells almost restored the proliferation of β 1 deficient up to the level of control cells (Fig. 6E). These results confirmed the role of this small GTPase in the control of YAP subcellular localization. In Rac1^{G12V} expressing cells, we also observed that the transient YAP localization at the cell periphery was reduced, suggesting that Rac1 could participate to YAP recruitment dynamics (Fig. 6F). Since the expression of an activated form of a small GTPase might lead to an artefactual activation of downstream effectors, we used a specific inhibitor of the Rac family (but not RhoA and Cdc42) to further confirm its role. Blocking Rac activity significantly diminished nuclear YAP. Similarly, in β 1 deficient cells or in PAK inhibited cells, the expression of the dominant negative form of merlin allowed YAP nuclear localization even in presence of Rac inhibitor (Fig 6G, 6H). Hence, our data supported an important role of the Rac/PAK/merlin signaling axis in regulating YAP nuclear translocation downstream of β 1 integrins.

β 1 integrin dependent targeting of Rac1 to the plasma membrane is mediated by p18/LAMTOR positive detergent resistant vesicles (DRM).

From the above results, β 1 integrins were required for PAK activation. However, we did not notice any significant reduction of Rac1-GTP content that could explain this (Fig. S5H). Therefore, we questioned whether β 1 integrins could control Rac1 targeting to ruffles and thereby PAK. Indeed, in β 1 deficient cells, indirect immunostaining revealed reduced Rac1 localization at the cell edges (Fig. 7A). Rac1, like other members of the RhoA GTPase family, are geranyl-geranyl modified in order to be targeted to detergent resistant membranes (DRM).

On the other hand, cell adhesion to fibronectin was shown to control the return of detergent resistant membrane vesicles that transport lipid microdomains to the plasma membrane in an Arf6 dependent manner (Balasubramanian et al., 2007; Boshans et al., 2000). Therefore, we wondered whether $\beta 1$ integrins, by modulating this vesicular trafficking, might control the return of activated Rac1 to the plasma membrane. Using cholera toxin B to follow DRM dynamics, we confirmed previous data showing that $\beta 1$ integrins are required for DRM vesicular trafficking back to the plasma membrane but not their endocytosis (Fig. S6A). In line with these observations, the expression of p18/LAMTOR, a specific DRM vesicle marker (Nada et al., 2009), showed a completely different distribution of p18/LAMTOR positive vesicles in $\beta 1$ integrin deficient cells in comparison to wild type cells (Fig. 7B). On the other hand, cell spreading on fibronectin led to an important redistribution of p18/LAMTOR positive vesicles toward the cell periphery of $\beta 1^{ff}$ cells (Fig. 7C). This suggested that the distribution of p18/LAMTOR containing vesicles was regulated in a $\beta 1$ integrin and a cell adhesion dependent manner. Finally, while Rac1 and p18/LAMTOR (ectopically expressed or endogenous) clearly co-localized during spreading in $\beta 1^{ff}$ cells (including at the cell edges), $\beta 1$ deficient cells displayed a significant reduction of p18/LAMTOR and Rac1 colocalization (Fig. 7D and 7E). To directly address the specific recruitment of Rac1 on p18/LAMTOR vesicles, we transiently expressed either GFP-Rac^{G12V} or p18-GFP in wild-type and $\beta 1$ deficient cells. Confirming the close proximity of these two proteins, we were able to detect an interaction between p18 and Rac1 that was significantly more robust in control cells compared to $\beta 1$ deficient cells (Fig. 7F, 7G). These observations further confirmed the previous confocal imaging for which p18 and Rac1 displayed a significant colocalization in control cells that was not obviously highlighted in $\beta 1$ deficient cells. Altogether, these data supported the hypothesis that activated Rac1 returned to the cell periphery via p18/LAMTOR positive vesicles, and proposed $\beta 1$ integrin as an important regulator of their dynamics. It is

noteworthy that under the same experimental conditions, Rho A did not coprecipitate with p18/LAMTOR, in good agreement with the absence of involvement of this G protein in YAP localization control during cell spreading (Fig. 7G).

β 1 integrins stabilize microtubules at the cell edges to allow efficient targeting of p18/LAMTOR vesicles back to the cell periphery.

Next, we wanted to unravel the mechanism by which β 1 integrins regulates Rac1 targeting to membrane ruffles. It was shown that cell adhesion favors microtubules targeting at the cell periphery where they are stabilized and acetylated through an integrin dependent process (Deakin and Turner, 2014; Wickstrom et al., 2010). Immunostaining of the microtubule network revealed that microtubules seldom reached the cell periphery in β 1^{-/-} cells in sharp contrast to cells expressing β 1 integrins, or upon microtubule stabilization by TSA (a general deacetylase inhibitor) (Fig. 8A). Along with these observations, in β 1 deficient cells, a severe decrease in tubulin acetylation was observed that was reverted by TSA (Fig. 8B). Co-labeling of microtubules and actin network suggested that connections between both cytoskeletons were not properly established in the absence of β 1 integrins (Fig. 8A). Since microtubules play an important role in long range vesicular transport, this defect might be responsible for the poor targeting of Rac1 to the plasma membrane. To verify this, we followed DRM positive vesicles dynamics using p18-eGFP as a marker. First, the analysis of p18-GFP expressing cells showed that those vesicles were often associated with microtubules (Fig. 8C). In β 1 deficient cells, increasing microtubules acetylation and thereby stability using TSA resulted in evenly distribution of p18-GFP in the cytoplasm suggesting a direct link between tubulin stability and p18/LAMTOR trafficking (Fig. 7D). Time-lapse video microscopy analyzes revealed that p18/LAMTOR dynamics were significantly reduced in the absence of

β 1 integrins (Movie 1 and 2). In addition, frames isolated from video microscopy showed that p18/LAMTOR positive vesicles dynamics were significantly reduced at the cell periphery of β 1 deficient cells compared to wild type (Fig. 8E). These data indicated that cell adhesion, by stabilizing microtubules, favored DRM vesicles transport back to the plasma membrane, and reinforced the view that the establishment of microtubules network was an important prerequisite for vesicular transport of DRM to the plasma membrane.

Our observations fitted with a model in which the primary cause of the poor YAP nuclear translocation observed upon disruption might be a defective vesicular transport that would account for a reduced Rac1 targeting to the plasma membrane. To confirm this hypothesis, we pharmacologically blocked vesicular trafficking to see how this would impact on YAP localization and phosphorylation. First, we used the lysosomotropic agent primaquine (PQ), known to block vesicles return to the plasma membrane (Strous et al., 1985; Woods et al., 2004). When added to cells, PQ induced YAP phosphorylation at the S127 residue that correlated with increased LATS1/2 phosphorylation (Fig. 9A). Consistent with these biochemical data, PQ blocked the translocation of YAP into the nucleus induced by cell adhesion on fibronectin (Fig. 9B). Similarly, treating wild-type cells with dynasore (a specific dynamin inhibitor) reduced the adhesion dependent YAP nuclear translocation as well as CTX trafficking back to the cell membrane (Fig. 9B, Fig. S6B).

Our hypothesis implied that microtubule based vesicular transport back to the plasma membrane was required to induce YAP nuclear translocation during cell spreading. Therefore, we treated suspended cells with nocodazole (a microtubule depolymerizing agent) to specifically block microtubules dependent return of DRM to the plasma membrane (ref) and then analyzed YAP subcellular localization. Indeed, the addition of nocodazole blocked YAP nuclear accumulation that was normally observed upon cell adhesion on fibronectin (Fig. 9C and 9D). It is noteworthy that at early spreading times, when YAP was not yet translocated to

the nucleus, microtubules did not reach the cell edges yet (Fig. 9E). Later, the interactions of microtubules with the plasma membrane were timely correlated with YAP nuclear localization (Fig. 9E and S2D). We observed extensive microtubules targeting of ruffles in which YAP was also localized.

Finally, if this model were correct the expression of Rac1^{G12V} would bypass the negative effect of nocodazole on YAP nuclear translocation. This was actually the case since in Rac1^{G12V} expressing cells spread on fibronectin, YAP was translocated into the nucleus even when nocodazole was added to the cells (on suspended cells and prior to re-adhesion), indicating that Rac1 acted downstream of microtubules in the mechanism of YAP activation (Fig. 9C, 9F).

Discussion

β 1-integrins control cell proliferation in a Rac1/PAK/YAP dependent manner.

Although, pioneering works have shown that integrins orchestrate the recruitment of growth factors and clustering of their receptors at the plasma membrane, (likely via cytoplasmic effectors such as FAK and Src), a clear picture of how integrins are involved in the control of cell proliferation is still missing (Miyamoto et al., 1996). Recently, integrins and cell-matrix adhesion were proposed to participate in the regulation of the Hippo signaling pathway (Elbediwy et al., 2016). Herein, we describe a molecular mechanism by which β 1 integrins control YAP nuclear localization. The loss of β 1 integrins is associated with a defect in osteoblast proliferation both in vivo and in vitro. Our work also confirmed β 1 integrins as the main cell surface receptors by which these cells are capable of linking YAP nuclear translocation to the sensing of the physical state of the extracellular matrix (Dupont et al., 2011). Additionally, it was previously reported that β 1 integrins also control cell proliferation in other tissues (Hirsch et al., 2002; Li et al., 2005). While our main data were obtained with osteoblasts, we observed a similar behavior in MEFs. Although we focused our work on non-transformed cells, we recently reported that both β 1 integrins and YAP are overexpressed in primary bone tumors in which they have been identified as poor prognostic markers (Bouvier et al., 2016). Knowing the role of β 1 integrins during tumor progression and their capability to sense the extracellular environment we can envision that β 1 dependent YAP nuclear translocation may play an important role in the tumorigenesis of solid tumors.

How that information is transmitted into the cell is ill-defined. Indeed, actin cytoskeleton was proposed to be critical in this regulation but the identification of a clear mechanism has not

been provided to date. Actin cytoskeleton and its dynamics are highly dependent on the regulation of Rho GTPases. Rac1, Cdc42, and RhoA that have been shown to participate in the modulation of YAP activity (Feng et al., 2014) (Reginensi et al., 2013). Our present data support a critical role for Rac1 in this process. Our results are in good agreement with recent reports showing that Arl4c triggers YAP nuclear translocation via the upregulation of Rac1 while blocking RhoA activity (Matsumoto et al., 2014). While our data do not highlight any role for RhoA in YAP nuclear translocation downstream of β 1 dependent cell adhesion, we are not ruling out that this small GTPase, that is an important actor regulating actin networks, is required for proper microtubules targeting. However, it is noteworthy that during cell spreading, integrin engagement inhibits RhoA activity in order to dynamically regulate actin cytoskeleton re-organization. This decrease in RhoA activity timely corresponds to YAP nuclear translocation, therefore a direct role of this small GTPase in adhesion dependent YAP nuclear translocation is very unlikely. Similarly, suspended cells display an elevated level of RhoA and yet YAP is sequestered in the cytoplasm. Definitely, the participation of RhoA in controlling YAP nuclear localization requires additional investigations to fully understand how precisely it contributes to the hippo pathway. One tentative explanation is that RhoA by increasing actin stress fibers (on spread cells) would favor microtubules anchoring and thereby vesicular trafficking. This would indeed, reconcile its role and our present observations in which we proposed that DRM trafficking is a critical effector of YAP activation.

Clearly, in the future, it will be important to gain a better view of how those GTPases crosstalk in space and time regarding their activation and recruitment of their downstream effectors and thereby specific outcomes such as actin remodeling or YAP nuclear localization. Rac1 is of particular interest since it both stimulates lamellipodial extensions and activates the PAK family. In line with the reduced Rac1 targeting to plasma membrane observed in β 1

integrin deficient cells, PAK activation and recruitment to the plasma membrane was also compromised. Herein, we proposed that this Rac1/PAK axis is critical for β 1 integrin-dependent YAP nuclear translocation to control cell proliferation along with cell protrusion dynamics. Moreover, our data provides a rationale for the reported role of Rac1 and its effector PAK in cell proliferation under both normal and pathological situations (Mira et al., 2000)(Okada et al., 2005).

DRM/Rac1 trafficking to the plasma membrane is controlled by integrin dependent adhesion

Rac1 that is activated on early endosomes, returns to the plasma membrane in a microtubule dependent manner (Balasubramanian et al., 2007). Rac1, like others monomeric G proteins belonging to the Rho family, is recruited on membranes after a post-translational modification that adds a geranylgeranyl lipid anchor. This modification favors its preferential recruitment on detergent resistant membranes (DRM). Further supporting the involvement of those DRM-localized small GTPase in the control of YAP activity, the pharmacological blockade of the addition of geranylgeranyl moiety efficiently interferes with YAP nuclear localization (herein and (Sorrentino et al., 2014)).

Our present work further indicates that in β 1 integrin deficient cells, DRM anterograde trafficking to the plasma membrane is severely compromised. Using p18/LAMTOR as a specific DRM marker, we also showed that DRM distribution was strongly dependent on β 1 integrin-mediated cell adhesion. In good agreement with the DRM dependent distribution of Rac1, this G protein was found associated with p18/LAMTOR vesicles. Recently, LAMTOR complex on vesicles was shown to be targeted to focal adhesions where it regulates their dynamics (Schiefermeier et al., 2014). These latter findings suggest a possible reciprocal

regulation between adhesion and vesicular trafficking to timely control adhesion site maturation with a local vesicles delivery. We added a novel piece to this concept by showing that vesicles targeting also orchestrated integrin dependent outside-in signaling.

Rac1/DRM trafficking defect in $\beta 1^{-/-}$ cells is due to deficient microtubule targeting

Microtubules targeting to cell protrusions is known to induce their stabilization and their acetylation where they have an active role in modulating focal adhesion dynamics (Kaverina et al., 1998; Wickstrom et al., 2010). In line with this, the lack of $\beta 1$ integrin expression resulted in a strong defect in microtubule targeting to the cell periphery correlated with a strong decrease in their acetylation level. As imaged by actin and tubulin double staining, both cytoskeleton networks are highly interconnected. Indeed, actin stress fibers are able to catch microtubules to guide their polymerization toward the cell edge (Kodama et al., 2003). Consistent with this view, the expression of an active form of mDIA to increase the formin-dependent actin polymerization is sufficient to revert the microtubules targeting defect when the integrin associated protein ILK is lost (Wickstrom et al., 2010). Stabilization of microtubules in their acetylated state (herein) allowed a similar rescue of their targeting to the cell periphery. Since microtubules are important tracks for long range vesicular trafficking (Mundy et al., 2002), their poor stability and targeting in $\beta 1$ deficient cells or upon cell detachment, likely impairs DRM vesicles anterograde transport and local delivery of Rac1 to specific plasma membrane locations. This, in turn, will stabilize and activates LATS in a membrane inhibitory complex allowing YAP phosphorylation and segregation in the cytoplasm. Indeed, in the present work we observed that the disruption of the microtubule network by nocodazole prevented adhesion dependent YAP translocation into the nucleus in control cells, a defect that was by bypassed by expressing constitutively active Rac1.

Transient recruitment of YAP and YAP regulators to membrane ruffles.

Spatiotemporal studies of YAP cellular localization during cell adhesion on fibronectin revealed that YAP was transiently associated with or recruited nearby the plasma membrane at specific locations corresponding to membrane ruffles. This transient presence of YAP precedes its progressive translocation into the nucleus that is compromised when $\beta 1$ integrins are removed. It appears that several key players such as NF2/merlin and LATS that negatively regulate YAP are also concentrated in membrane ruffles. This observation fits with previous data showing that LATS is recruited and activated by NF2/merlin at the cell membrane (Yin et al., 2013) and with NF2/merlin localization in membrane ruffles (Gonzalez-Agosti et al., 1996). Our data extended the picture and showed that PAK negatively regulates YAP/merlin interaction at the plasma membrane. Recently, it has been reported that merlin phosphorylation at S518 reduces its interaction with Amot family members (a YAP interacting partners). Amot recruitment to merlin stabilizes the open conformation of the latter, that in turn allows LATS binding on the FERM domain of merlin. Accordingly, phosphorylation of merlin would reduce both its interaction with Amot and LATS. Our present data are in line with these observations, and supports a role of a $\beta 1$ dependent regulation of PAK that would increase merlin phosphorylation and thereby decrease YAP and LATS recruitment on merlin. Merlin would act as a scaffolding protein facilitating YAP phosphorylation by stabilizing within the same complex the protein kinase and its substrate.

How YAP is dephosphorylated upon its release from the plasma membrane is still an open question, but an attractive hypothesis could be that the cytoplasmic pool of free YAP will interact with PP2A as already demonstrated in the skin (Schlegelmilch et al., 2011). The molecular basis underlying YAP targeting to membrane ruffles remains to be elucidated.

However, it is noteworthy that the cell adhesion molecule Layilin, a known interactor of both merlin and talin (Bono et al., 2005), is similarly located in ruffles (Borowsky and Hynes, 1998). Therefore, adhesive contacts in which Layilin is recruited may act as precursor template for integrin dependent cell-matrix adhesion sites that will then be targeted by microtubules for maturation and expansion via the local delivery of Rac1 to trigger firm adhesion in the periphery. β 1 integrin-mediated stabilization of microtubules would create a positive feedback loop to further promote the targeting of small GTPases such as Rac1 to the plasma membrane. Our current data provide a molecular picture for the well-characterized observations that cell migration and invasion are coupled with the acquisition of a proliferative state. This might be particularly relevant as soon as the interaction between cells is perturbed, for instance during wound healing and tissue renewal. In this context, β 1 integrin dependent signaling will allow the local delivery and activation of Rac1/PAK/merlin to coordinate cell spreading/migration with the control of LATS/YAP activity. It opens new avenues of therapeutic strategies to block the oncogenic activity of YAP via the inhibition of exocytosis with well-characterized molecules such as primaquine or inhibitors of the mevalonate pathway.

METHODS

Mouse Genetics. Mouse strain with floxed alleles of $\beta 1$ integrin (*Itgb1^{tm1Ref}*) have been described previously (Potocnik et al., 2000) and were kindly provided by Dr R. Fässler (Max Planck Institute, Martinsried, Germany). The *Osx1-GFP:Cre* deleter mouse was described previously (Rodda and McMahon, 2006) and was kindly provided by Dr A. McMahon. Conditional knock-in mice bearing the G12D mutation at the K-Ras locus (*Kras^{tm4Tyj}*) were obtained from the NCI mouse repository and originally generated by Dr T. Jacks (Tuveson et al., 2004). Mice were kept under regular conditions of husbandry accordingly to the European rules and approved by the University Ethical committee.

Cell lines and MSC culture. Primary MEFs were isolated at embryonic day 14.5 (E14.5) from K-Ras^{G12D} $\beta 1^{ff}$ or K-Ras^{G12D} $\beta 1^{+/f}$ embryos using a standard procedure. Cells were immortalized with the large SV40 T antigen. Immortalized K-Ras^{G12D}; $\beta 1^{ff}$ and K-Ras^{G12D} $\beta 1^{+/f}$ cells were infected with an adenoviral supernatant encoding the Cre recombinase for 1h in PBS supplemented with 2% FCS and 1mM MgCl₂. All other cell lines were generated upon retrovirus transduction and transgene expression was verified by Western blotting and immunostaining.

Primary mesenchymal stem cells (MSC) were isolated from wt and $\beta 1^{\text{Ost-ko}}$ bone marrow and selected on their capacity to adhere on plastic (Soleimani and Nadri, 2009). The differentiation process was visualized by alkaline phosphatase staining described in (Bouvard et al., 2007), and the number of alkaline phosphatase colonies having a diameter higher than 0,5mm was evaluated using a stereomicroscope (Olympus SZX10).

Antibodies and expression vectors. Anti-BrdU, -Flag (M2), Anti-YAP/TAZ, -PhosphoYAP, phosphoLATS, -LATS, -phosphoERK, -ERK, α tubulin, phosphoPAK, were from Cell Signaling (Ozyme, St Quentin en Yvelines France). Mouse β 1 integrin (MB1.2) were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France), human β 1 integrin 9EG7 was produced from hybridoma. Anti-phospho-ELK, Anti-YAP, α PAK, RhoA were from Santa Cruz (Heidelberg, Germany). NF2, Actin, Acetylated Tubulin were from Sigma Aldrich. β 1 integrin clone 4B7R antibody from Abcam (Paris, France) was used. Anti-alpha 1 sodium potassium ATPase, Lamp1 were from Abcam (Paris, France). The anti-caveolin, Rac1, RalA, CD63 were from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France). The anti p18/LAMTOR was kindly provided by Dr S. Manié (Lyon, France). The anti-phosphotyrosine monoclonal antibody 4G10 used as hybridoma supernatant was produced in our laboratory. The human β 1-expressing construct was based on the pCL-MFG retroviral vector as described previously (Brunner et al., 2011). pBABEpuro-FlagYAP2 was from Dr. M. Sudol (Addgene #27472). Flag tagged YAP2^{5SA} was from Dr. K.L. Guan (Addgene #27371)) was subcloned into the pQCXIP retroviral vector. pBABEpuro-MEK1^{Q56P} and pBABEpuro^{ERK2MEK1-LA} were kindly provided by Dr. M. Barbacid. pEGFP-Rac1^{G12V}, pEGFP-Rac1^{Q61L}, pEGFP-Cdc42^{G12V} and pEGFP-RhoA^{G14V} were gift from Dr C. Gauthier-Rouvière, pYFP-RhoA was from Dr. A. Mettouchi. The insert GFP-Rac1^{G12V} was subcloned into the retroviral vector pBABEpuro. pCMV6M-PAK1^{T423E}, encoding for PAK1-CA, was from Dr Chernoff (Addgene # 12208). p18-eGFP-was kindly provided by Dr Okada. pBabe NF2wt and pBabe-NF2BB were from Dr. T. Jacks (Addgene#14116 and #14117, respectively). GST-Rhotekin was from Dr. M. Schwartz (Addgene #15247).

Forskolin (FSK), Primaquine (PQ), IPA3, GGTI, and Cholera toxin B-FITC were from Sigma Aldrich (l'Isle d'Abeau, France). and ETH1864 from Tocris (RD systems, Lille France)

Transfections and Infections. HEK GP 293 cells (Clontech, St Germain en Laye, France) were transfected with plasmid DNA using ExGen500 Transfection reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) according to manufacturer's instructions. Osteoblast retroviral infections were performed as previously described (Bouvard et al., 2007).

Histomorphometric analysis. Tibiae were fixed and embedded in methacrylate. Sections were deplasticized and stained for Masson-Goldner with hematoxylin (Gill II), acid fuchsin/ponceau xylidine, and phosphomolybdic acid/orange G to stain the cells and osteoid, and light green to stain the mineralized matrix (Bentmann et al., 2009). The total absolute number of osteoblasts in the area extending from 150 μ m below the growth plate down 2 mm was evaluated and reported.

TUNEL and BrdU *in vivo* staining assay. Fluorescein In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Meylan, France) was used for TUNEL staining. Briefly, bone sections were deparaffinized and hydrated. Antigen retrieval and endogenous peroxidase quenching were performed then TUNEL staining was achieved according to manufacturer's instructions. The TUNEL-positive cells and total cells (DAPI positive) in five areas of periosteum and trabecular bone from each of the mice in the experiments were counted under a 20 \times objective microscope lens.

For BrdU staining, mice were sacrificed two hours after being injected with BrdU (150 μ g/g). Following deparaffinization and hydration, sections were treated 20min with HCl 4N, and then antigen retrieval was performed using trypsin 10min at 37°C. Finally, bone sections were immunostained for BrdU as described in the Immunofluorescence Staining section.

Immunofluorescence Staining. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde-PBS for 15min. Following permeabilization in PBS-TritonX100 (0.2%) and blocking with goat serum (PBS-Goat serum 10%), cells were incubated with primary antibodies during 1 hour. Secondary antibodies used were conjugated with Alexa 488 and Alexa 555 from Jackson ImmunoResearch (Interchim, Montluçon, France). Samples were mounted using Mowiol 4-88 reagents (Sigma Aldrich, l'Isle d'Abeau, France) supplemented or not with DAPI (Life technologies, St Aubin, France) and were analyzed using Axioimager microscope or LSM 510 laser scanning confocal microscope (Carl Zeiss SAS, Le Pecq, France.).

Cell fractionation. All the operations were carried out at 4°C. Cells from 4 petri 10 cm dishes were washed twice with PBS then scrapped in 1mL PBS with a rubber policeman. They were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes. The pellet was re-suspended in a hypotonic buffer made of 10 mM HEPES pH 7.4, EDTA 1 mM, and a cocktail of protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostic, Meylan, France) and phosphatase inhibitors (Sigma Aldrich, l'Isle d'Abeau, France), and incubated 10 min on ice. The cells were broken with a Dounce homogenizer (Piston B, 25 stokes). Unbroken cells and nucleus were eliminated by a centrifugation at 2500 rpm for 5 min. Mitochondria were further removed by a 6000 rpm centrifugation for 15 min. Supernatant was proceeded either to isolate total membrane fraction or to isolate a plasma membrane and endosome enriched fraction versus endo-lysosomal membrane. A characterization of the different compartment is shown in figure S6C.

For cytoplasm and total membrane recovery, the supernatant was centrifuged at 120000 rpm, 4°C, 20 min in a fixed angle AT120 rotor in a Hitachi micro ultracentrifuge. The whole membrane fraction was recovered from the pellet fraction after solubilizing in 50mM Tris

pH7.4, 1% TritonX100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 min at 4°C. Cytoplasmic proteins were recovered from the previous supernatant.

For endosome/plasma membranes and endo-lysosomal membranes, the supernatant was first centrifuged for 60 min at 15000g to purify the plasma and endosome membranes and then at 1200000rpm for 20 min in a fixed angle AT120 rotor in a Hitachi micro ultracentrifuge to isolate endo-lysosome from cytoplasm.

GST-Rhotekin and GST-PAK-Crib based pulldown assays were carried out as previously reported in (Dib et al., 2003), Immunoprecipitation using GFP was carried out with the GFP-Trap magnetic beads following manufacturer's instructions (Chromotek, Martinsreid, Germany). Immunoprecipitation using the Flag epitope was done with M2 antibody coupled magnetic beads (Sigma Aldrich, L'Isle d'Abeau France).

Immunoblotting. Cells were lysed using RIPA lysis buffer containing proteases and phosphatases inhibitors. Cell lysates were centrifuged at 15 000rpm for 30 min at 4°C, and supernatants were used for immunoblotting using standard protocol.

RNA Extraction, Reverse Transcription, qPCR and transcriptomic analyses. Total RNA was isolated using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and RNeasy Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Total RNA quantification was performed using the Nanodrop ND- 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). RNA was reverse-transcribed with the iScript Reverse Transcription Supermix (Biorad, Hercules, USA). Real-time qPCR analysis was performed using iTaq Universal SybrGreen Supermix (Biorad, Hercules, USA) on Biorad CFX96. Primers list used for qPCR analysis is provided in Table S1. The integrity of the extracted

RNAs was assessed with the Bioanalyzer 2100 and the RNA6000 Nano kit (Agilent Technologies Incorporation, Santa Clara, USA). A RNA integrity number (RIN) greater or equal to 7.00 was achieved for all samples. No sign of DNA contamination was detected in any of the samples analyzed. The starting amount of total RNA used for the reactions was 400 nanograms per sample, for all samples. The Illumina Total Prep RNA Amplification Kit (Applied Biosystems / Ambion, Austin, USA) was used to generate biotinylated, amplified cRNA according to the manufacturer recommendations. Hybridization, staining and detection of cRNAs on Illumina Mouse WG-6 v2 Expression BeadChips were performed according to the manufacturer's protocol. The MouseWG-6 v2.0 BeadChip profiles more than 45,200 transcripts derived from the National Center for Biotechnology Information Reference Sequence (NCBI RefSeq) database (Build 36, Release 22), the Mouse Exonic Evidence Based Oligonucleotide (MEEBO) set as well as from exemplar protein-coding sequences described in the RIKEN FANTOM2 database. The Illumina I-Scan system was used to scan all Expression BeadChips, according to Illumina recommendations.

Using the Gene Expression Module 1.9.0 of GenomeStudio V2011.1 software (Illumina - USA), the Quantile normalization method was applied to the primary probe data. Processed probe data were then filtered according to the following criteria: minimal signal intensity fold change of 1.50 across all samples, minimal probe signal intensity absolute change of 150 across all samples. Filtered data were then log₂-transformed, and the expression values compared between the $\beta 1^{-/-}$ cells and wild-type $\beta 1^{+/+}$ samples using Omics Explorer 3.2(42) (Qlucore, Sweden). Genes were considered differentially expressed when their expression level satisfied two criteria: i) the adjusted p-value (q-value) was < 0.01 (which corresponded to a $|R| > 0.96$ ii) the absolute fold change between the mean expression value in the samples from mutant cells compared to that in controls was > 1.5 . Two-dimension hierarchical

clustering analysis was performed using Omics Explorer 3.2(42) software on normalized data (mean=0, variance=1) with the average linkage option.

Cell Proliferation Assay. Cells were treated with BrdU or alternatively with EdU (10 μ M, Sigma) during 1 hour or 30 min for osteoblasts and MEFs respectively. For BrdU staining, cells were fixed with Carnoy's fixative (75% methanol: 25% glacial acetic acid) 20 min at -20°C, and then denatured using 2M HCl 1hour at 37°C. Cells were then immunostained for BrdU as described earlier. BrdU positive cells were counted under Axioimager microscope (Carl Zeiss, Inc.). For EdU staining, manufacturer's protocol was used, after an incubation of cells with EdU for 30 minutes.

Quantification of YAP nuclear localization. Cells were immuno-stained with an anti YAP and immuno-microscopy was carried out with a confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM510) equipped with a 63X planapo oil immersion objective (n.a. 1.4) and a pinhole set to one Airy. On each cell image a ROI was defined positioned either within the nuclei, or in the cytoplasmic area next to the nuclei envelope. Since the thickness of the two ROI positions were likely identical, the average fluorescence intensity is likely proportional to YAP concentration and was estimated using Image J public software. Within the same cell, the ratio of both fluorescence intensities reflects YAP concentration ratio in both compartments. This ratio was represented under a logarithmic scale in order to have an identical range for positive and negative ratios. Measurements were performed with $n \geq 50$ and statistical significance was estimated with Student test. Boxplots were performed using R public software.

Colocalization microscopy. Confocal images were taken using LSM510 Zeiss microscope. Visualization and quantification of colocalized pixels were carries out using Wright cell imaging facility plugins of Image J (http://wwwfacilities.uhnresearch.ca/wcif/imagej/colour_analysis.htm).

References

- Alfthan, K., L. Heiska, M. Grönholm, G.H. Renkema, and O. Carpén. 2004. Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylates merlin at serine 518 independently of p21-activated kinase and promotes merlin-ezrin heterodimerization. *J Biol Chem.* 279:18559-18566.
- Assoian, R.K., and M.A. Schwartz. 2001. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. *Curr Opin Genet Dev.* 11:48-53.
- Balasubramanian, N., D.W. Scott, J.D. Castle, J.E. Casanova, and M.A. Schwartz. 2007. Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nat Cell Biol.* 9:1381-1391.
- Bentmann, A., N. Kawelke, D. Moss, H. Zentgraf, Y. Bala, I. Berger, J.A. Gasser, and I.A. Nakchbandi. 2009. Circulating fibronectin affects bone matrix, whereas osteoblast fibronectin modulates osteoblast function. *J Bone Miner Res.* 25:706-715.
- Bono, P., E. Cordero, K. Johnson, M. Borowsky, V. Ramesh, T. Jacks, and R.O. Hynes. 2005. Layilin, a cell surface hyaluronan receptor, interacts with merlin and radixin. *Exp Cell Res.* 308:177-187.
- Borowsky, M.L., and R.O. Hynes. 1998. Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles. *J Cell Biol.* 143:429-442.
- Boshans, R.L., S. Szanto, L. van Aelst, and C. D'Souza-Schorey. 2000. ADP-ribosylation factor 6 regulates actin cytoskeleton remodeling in coordination with Rac1 and RhoA. *Mol Cell Biol.* 20:3685-3694.
- Bouvard, D., A. Aszodi, G. Kostka, M.R. Block, C. Albiges-Rizo, and R. Fassler. 2007. Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice. *Development.* 134:2615-2625.
- Bouvard, D., J. Pouwels, N. De Franceschi, and J. Ivaska. 2013. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14:430-442.
- Bouvier, C., N. Macagno, Q. Nguyen, A. Loundou, C. Jiguet-Jiglaire, J.C. Gentet, J.L. Jouve, A. Rochwerger, J.C. Mattei, D. Bouvard, and S. Salas. 2016. Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β 1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget.* 7:64702-64710.
- Brunner, M., A. Millon-Fremillon, G. Chevalier, I.A. Nakchbandi, D. Mosher, M.R. Block, C. Albiges-Rizo, and D. Bouvard. 2011. Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J Cell Biol.* 194:307-322.
- Deakin, N.O., and C.E. Turner. 2014. Paxillin inhibits HDAC6 to regulate microtubule acetylation, Golgi structure, and polarized migration. *J Cell Biol.* 206:395-413.
- Dib, K., F. Melander, L. Axelsson, M.C. Dagher, P. Aspenström, and T. Andersson. 2003. Down-regulation of Rac activity during beta 2 integrin-mediated adhesion of human neutrophils. *J Biol Chem.* 278:24181-24188.
- Dupont, S., L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, and S. Piccolo. 2011. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 474:179-183.
- Elbediwy, A., Z.I. Vincent-Mistiaen, B. Spencer-Dene, R.K. Stone, S. Boeing, S.K. Wculek, J. Cordero, E.H. Tan, R. Ridgway, V.G. Brunton, E. Sahai, H. Gerhardt, A. Behrens, I. Malanchi, O.J. Sansom, and B.J. Thompson. 2016. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis. *Development.* 143:1674-1687.
- Feng, X., M.S. Degese, R. Iglesias-Bartolome, J.P. Vaque, A.A. Molinolo, M. Rodrigues, M.R. Zaidi, B.R. Ksander, G. Merlino, A. Sodhi, Q. Chen, and J.S. Gutkind. 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.

- Gimond, C., A. van Der Flier, S. van Delft, C. Brakebusch, I. Kuikman, J.G. Collard, R. Fassler, and A. Sonnenberg. 1999. Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol.* 147:1325-1340.
- Gonzalez-Agosti, C., L. Xu, D. Pinney, R. Beauchamp, W. Hobbs, J. Gusella, and V. Ramesh. 1996. The merlin tumor suppressor localizes preferentially in membrane ruffles. *Oncogene.* 13:1239-1247.
- Harvey, K.F., C.M. Pflieger, and I.K. Hariharan. 2003. The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell.* 114:457-467.
- Hirsch, E., L. Barberis, M. Brancaccio, O. Azzolino, D. Xu, J.M. Kyriakis, L. Silengo, F.G. Giancotti, G. Tarone, R. Fassler, and F. Altruda. 2002. Defective Rac-mediated proliferation and survival after targeted mutation of the beta1 integrin cytodomain. *J Cell Biol.* 157:481-492.
- Howe, A.K., and R.L. Juliano. 2000. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol.* 2:593-600.
- Huang, S., and D.E. Ingber. 2005. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell.* 8:175-176.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.
- Jackson, E.L., N. Willis, K. Mercer, R.T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, and D.A. Tuveson. 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev.* 15:3243-3248.
- Joyce, P.L., and A.D. Cox. 2003. Rac1 and Rac3 are targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling. *Cancer Res.* 63:7959-7967.
- Kanai, F., P.A. Marignani, D. Sarbassova, R. Yagi, R.A. Hall, M. Donowitz, A. Hisaminato, T. Fujiwara, Y. Ito, L.C. Cantley, and M.B. Yaffe. 2000. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* 19:6778-6791.
- Kaverina, I., K. Rottner, and J.V. Small. 1998. Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol.* 142:181-190.
- Kim, M., S. Lee, S. Kuninaka, H. Saya, H. Lee, and D.S. Lim. 2013. cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. *EMBO J.* 32:1543-1555.
- Kim, N.G., and B.M. Gumbiner. 2015. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. *J Cell Biol.* 210:503-515.
- Kodama, A., I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs. 2003. ACF7: an essential integrator of microtubule dynamics. *Cell.* 115:343-354.
- Li, N., Y. Zhang, M.J. Naylor, F. Schatzmann, F. Maurer, T. Wintermantel, G. Schuetz, U. Mueller, C.H. Streuli, and N.E. Hynes. 2005. Beta1 integrins regulate mammary gland proliferation and maintain the integrity of mammary alveoli. *EMBO J.* 24:1942-1953.
- Li, Q., A. Lau, T.J. Morris, L. Guo, C.B. Fordyce, and E.F. Stanley. 2004. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci.* 24:4070-4081.
- Li, Y., H. Zhou, F. Li, S.W. Chan, Z. Lin, Z. Wei, Z. Yang, F. Guo, C.J. Lim, W. Xing, Y. Shen, W. Hong, J. Long, and M. Zhang. 2015. Angiomin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Res.* 25:801-817.
- Matsumoto, S., S. Fujii, A. Sato, S. Ibuka, Y. Kagawa, M. Ishii, and A. Kikuchi. 2014. A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures. *EMBO J.* 33:702-718.
- Meng, Z., T. Moroishi, and K.L. Guan. 2016. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 30:1-17.
- Mira, J.P., V. Benard, J. Groffen, L.C. Sanders, and U.G. Knaus. 2000. Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:185-189.

- Miyamoto, S., H. Teramoto, J.S. Gutkind, and K.M. Yamada. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol.* 135:1633-1642.
- Mundy, D.I., T. Machleidt, Y.S. Ying, R.G. Anderson, and G.S. Bloom. 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 115:4327-4339.
- Nada, S., A. Hondo, A. Kasai, M. Koike, K. Saito, Y. Uchiyama, and M. Okada. 2009. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *EMBO J.* 28:477-489.
- Okada, T., M. Lopez-Lago, and F.G. Giancotti. 2005. Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J Cell Biol.* 171:361-371.
- Pan, D. 2010. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell.* 19:491-505.
- Parrini, M.C., J. Camonis, M. Matsuda, and J. de Gunzburg. 2009. Dissecting activation of the PAK1 kinase at protrusions in living cells. *J Biol Chem.* 284:24133-24143.
- Potocnik, A.J., C. Brakebusch, and R. Fassler. 2000. Fetal and adult hematopoietic stem cells require beta1 integrin function for colonizing fetal liver, spleen, and bone marrow. *Immunity.* 12:653-663.
- Reginensi, A., R.P. Scott, A. Gregorieff, M. Bagherie-Lachidan, C. Chung, D.S. Lim, T. Pawson, J. Wrana, and H. McNeill. 2013. Yap- and Cdc42-dependent nephrogenesis and morphogenesis during mouse kidney development. *PLoS Genet.* 9:e1003380.
- Rodda, S.J., and A.P. McMahon. 2006. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development.* 133:3231-3244.
- Schiefermeier, N., J.M. Scheffler, M.E. de Araujo, T. Stasyk, T. Yordanov, H.L. Ebner, M. Offterdinger, S. Munck, M.W. Hess, S.A. Wickstrom, A. Lange, W. Wunderlich, R. Fassler, D. Teis, and L.A. Huber. 2014. The late endosomal p14-MP1 (LAMTOR2/3) complex regulates focal adhesion dynamics during cell migration. *J Cell Biol.* 205:525-540.
- Schlegelmilch, K., M. Mohseni, O. Kirak, J. Pruszk, J.R. Rodriguez, D. Zhou, B.T. Kreger, V. Vasioukhin, J. Avruch, T.R. Brummelkamp, and F.D. Camargo. 2011. Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. *Cell.* 144:782-795.
- Sells, M.A., A. Pfaff, and J. Chernoff. 2000. Temporal and spatial distribution of activated Pak1 in fibroblasts. *J Cell Biol.* 151:1449-1458.
- Shaw, R.J., J.G. Paez, M. Curto, A. Yaktine, W.M. Pruitt, I. Saotome, J.P. O'Bryan, V. Gupta, N. Ratner, C.J. Der, T. Jacks, and A.I. McClatchey. 2001. The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell.* 1:63-72.
- Soleimani, M., and S. Nadri. 2009. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc.* 4:102-106.
- Sorrentino, G., N. Ruggeri, V. Specchia, M. Cordenonsi, M. Mano, S. Dupont, A. Manfrin, E. Ingallina, R. Sommaggio, S. Piazza, A. Rosato, S. Piccolo, and G. Del Sal. 2014. Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat Cell Biol.* 16:357-366.
- Strous, G.J., A. Du Maine, J.E. Zijderhand-Bleekemolen, J.W. Slot, and A.L. Schwartz. 1985. Effect of lysosomotropic amines on the secretory pathway and on the recycling of the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells. *J Cell Biol.* 101:531-539.
- Tuveson, D.A., A.T. Shaw, N.A. Willis, D.P. Silver, E.L. Jackson, S. Chang, K.L. Mercer, R. Grochow, H. Hock, D. Crowley, S.R. Hingorani, T. Zaks, C. King, M.A. Jacobetz, L. Wang, R.T. Bronson, S.H. Orkin, R.A. DePinho, and T. Jacks. 2004. Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell.* 5:375-387.
- Wickstrom, S.A., A. Lange, M.W. Hess, J. Polleux, J.P. Spatz, M. Kruger, K. Pfaller, A. Lambacher, W. Bloch, M. Mann, L.A. Huber, and R. Fassler. 2010. Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Dev Cell.* 19:574-588.
- Woods, A.J., D.P. White, P.T. Caswell, and J.C. Norman. 2004. PKD1/PKCmu promotes alpha5beta3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO J.* 23:2531-2543.

- Yin, F., J. Yu, Y. Zheng, Q. Chen, N. Zhang, and D. Pan. 2013. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell*. 154:1342-1355.
- Yu, F.X., Y. Zhang, H.W. Park, J.L. Jewell, Q. Chen, Y. Deng, D. Pan, S.S. Taylor, Z.C. Lai, and K.L. Guan. 2013. Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev*. 27:1223-1232.
- Zhao, B., L. Li, L. Wang, C.Y. Wang, J. Yu, and K.L. Guan. 2012. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev*. 26:54-68.
- Zhao, B., K. Tumaneng, and K.L. Guan. 2011. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol*. 13:877-883.
- Zhu, X., and R.K. Assoian. 1995. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell*. 6:273-282.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Pr. R. Fässler, Drs. A. McMahon, R. Meuwissen and T. Jacks for sharing their mice. We warmly thank Pr. J. Bos, Drs K.L. Guan, M. Barbacid, C. Gauthier-Rouvière, Okada, A. Mettouchi, and Dr Chernoff for their precious help in sharing their constructs. We also would like to thank Dr S. Dimitrov for his strong support. MB was supported with a fellowship from “Ministère de la Recherche” and INCa (Institut National du Cancer) grant. This work was funded by grants from the CLARA canceropole, INCa and the SCFE.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. $\beta 1$ integrins regulate osteoblast cell proliferation *in vivo* and *in vitro*.

- A.** Histo-morphometric analysis of osteoblast number on wild-type ($\beta 1^{ff}$) and Osx-Cre; $\beta 1^{ff}$ ($\beta 1^{Ost-KO}$) 30-days-old mice tibias (*: $p < 0.05$).
- B.** Quantification of Alkaline Phosphatase (ALP) positive colonies from wild-type and mutant mice mesenchymal stem cells (from femurs, **: $p < 0.001$).
- C.** Representative ALP staining of mesenchymal stem cells after 2 weeks in osteogenic medium (Scale bar represents 1mm).
- D. and F.** Quantification of apoptotic (TUNEL-positive) and proliferating (BrdU-positive) cells in periosteum and trabecular bone in wild-type and mutant 30-days-old mice tibias (p; periosteum; t; trabecular bone; ns; non-significant difference; **: $p < 0.001$).
- E. and G.** Representative TUNEL and BrdU staining on trabecular bone sections from wild-type and mutant mouse tibias (hc, hypertrophic cartilage; tb, trabecular bone; bm, bone marrow) (Scale bar represent $40\mu\text{m}$).
- H.** *In vitro* proliferation rate of wild-type ($\beta 1^{ff}$) and $\beta 1$ integrin deficient ($\beta 1^{-/-}$) osteoblasts (**: $p < 0.001$).

Figure 2. $\beta 1$ integrins regulate YAP nuclear localization and activity.

- A.** Immunostaining of YAP (red) and $\beta 1$ integrins (9EG7, green) on $\beta 1^{ff}$; $\beta 1^{-/-}$; and $\beta 1$ rescued osteoblasts (Scale bar represents $10\mu\text{m}$).
- B.** Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio, $n > 50$ cells for each condition. $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ cells were spread overnight on fibronectin ($10\mu\text{g/ml}$). Represented in a logarithmic scale. ***: $p \text{ Value} < 0.0001$.

- C. RT-qPCR analysis of gene expression in $\beta 1^{-/-}$ cells normalized to $\beta 1^{f/f}$ cells (green line, set to 1). Results from 4 independent experiments.
- D. Analysis of YAP and LATS phosphorylation (YAP^{pS127}, LATS1/2^{pS909}), and total YAP and LATS in $\beta 1^{f/f}$; $\beta 1^{-/-}$; and $\beta 1$ rescue osteoblasts. Actin is shown as loading control.
- E. Immunostaining of YAP on $\beta 1^{f/f}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts expressing or not the YAP^{5SA} mutant (Scale bar represents 10 μ m).
- F. BrdU based quantification of the proliferation rate of $\beta 1^{f/f}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts expressing or not the YAP^{5SA} mutant (ns; non-significant difference, **; p<0.001).

Figure 3. Dynamic of YAP localization at cell edges.

- A. Immunostaining of YAP (red) and YAP^{pS127} (green) on $\beta 1^{f/f}$ osteoblasts (upper panel) or $\beta 1^{-/-}$ (lower panels) (Scale bar represents 10 μ m). Quantitative analysis by intensity correlation was performed to visualize and quantify the colocalization between YAP and its phosphorylated form.
- B. Quantification of $\beta 1^{f/f}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts displaying YAP staining at cell edges (as shown by arrows in panel A for $\beta 1^{-/-}$ cells) at different time points during cell spreading on fibronectin (10 μ g/ml).
- C. Immunolocalization of Yap (green) and TagRFP-cortactin in membrane extensions in $\beta 1^{f/f}$ osteoblasts spread on fibronectin (10 μ g/ml). Scale bar represents 10 μ m.
- D. Immunostaining of YAP (red) and LATS (green, upper panel) or NF2/merlin (green, lower panel) on $\beta 1^{f/f}$ osteoblasts (Scale bar represents 10 μ m). Quantitative analysis by intensity correlation was performed to visualize and quantify the colocalization.

E. Western blot analysis of LATS^{pS909}, LATS, YAP^{S127}, NF2/merlin, and caveolin (Cav) in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts after subcellular fractionation to isolate the 15000 rpm fraction (PE) and the 120 000 rpm fraction (EL). The two arrows indicate phosphoNF2 (upper band) and NF2 (lower band), respectively.

F. YAP and YAP^{pS127} in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts were analyzed by Western blotting after the separation of the total membrane fraction (M) from the cytoplasmic fraction (C). Left panel: $\beta 1^{ff}$ osteoblasts were treated or not with forskolin (10 μ M, 1h) prior to cell fractionation to increase LATS-dependent YAP phosphorylation. Tubulin and Ral A were used as cytoplasmic and membrane fraction loading controls, respectively. Right panel: $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts were used to isolate cytoplasmic and membrane fraction and submitted to Western blotting to detect YAP and YAP^{pS127}. Tubulin and Ral A were used as cytoplasmic and membrane fraction loading control, respectively. YAP^{pS127}/YAP ratio was measured using ImageJ software.

Figure 4. $\beta 1$ integrins control of YAP nuclear translocation in a merlin dependent manner.

A. Immunostaining of YAP (red) in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ cells (Ctl), or stably expressing NF2^{BB} mutant. Scale bar represents 10 μ m.

B. Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio, n>50 cells, represented in a logarithmic scale. $\beta 1^{ff}$, $\beta 1^{-/-}$, $\beta 1^{ff}$ expressing NF2^{BB} and $\beta 1^{-/-}$ expressing NF2^{BB} cells were spread on fibronectin (10 μ g/ml) and then stained for YAP. (***: p < 0,0001; ns: not significant).

C. Western blot analysis of YAP, YAP^{pS127} and merlin/NF2 (NF2) in $\beta 1^{ff}$, $\beta 1^{-/-}$ expressing or not the NF2^{BB} mutant. Actin was used as loading control.

- D. EdU based quantification of the proliferation rate of $\beta 1^{f/f}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts expressing or not (Ctl) the NF2^{BB} mutant (ns; non-significant difference, **, $p < 0.001$).
- E. RT-qPCR analysis of gene expression in $\beta 1^{-/-}$ and $\beta 1^{-/-}$ expressing NF2^{BB} cells gene expression was normalized to $\beta 1^{f/f}$ cells (green line, set to 1). Results from 4 independent experiments.
- F. Western blot analysis of merlin/NF2 (NF2) and YAP from $\beta 1^{f/f}$ and $\beta 1^{-/-}$ stably expressing Flag-YAP. Cells were fractionated to isolate total cell membranes from the cytoplasm; then YAP was immunoprecipitated using the flag epitope. The presence of merlin was visualized in the different fractions. Merlin was also immunoblotted from the input fraction.

Figure 5. PAK acts downstream of $\beta 1$ integrins to control adhesion dependent YAP localization and regulates YAP recruitment to merlin.

- A. Western blot analysis of PAK and PAK1^{T423} in $\beta 1^{f/f}$, $\beta 1^{-/-}$ and $\beta 1^{rescue}$ osteoblasts. Actin was used as loading control.
- B. Western blot analysis of endogenous Rac1, GFP-Rac1 (GFP) and PAK in $\beta 1^{f/f}$ $\beta 1^{-/-}$ and $\beta 1^{-/-}$ stably expressing GFP-Rac1^{G12V} after cell fractionation to isolate total cell membranes (M) and cytoplasm (C). Tubulin and Ral A were used as cytoplasmic and membrane markers, respectively.
- C. Left panel: Immunolocalization of YAP in $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts transiently transfected with the constitutively active eGFP-PAK1 (PAK1^{T423E}). Scale bar represents 10 μ m. Right panel: Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio in $\beta 1^{-/-}$ and $\beta 1^{-/-}$ transfected with activated PAK1. Cells were spread overnight on fibronectin (10 μ g/ml). $n > 20$ cells, represented in a logarithmic scale. $p < 0.0001$.

D. Western blot analysis of merlin/NF2 (NF2) and YAP from $\beta 1^{ff}$ and IPA3 treated cells stably expressing Flag-YAP. Cells were fractionated to isolate the total cell membranes and the cytoplasm; then YAP was immunoprecipitated using the flag epitope. The presence of merlin was visualized in different fractions. Merlin was also immunoblotted from the input fraction.

E. $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{ff}$ control cells (Ctl) or stably expressing the NF2^{BB} mutant were treated with the PAK inhibitor IPA3 (10 μ M) for 30 min. in suspension and then allowed to spread for 1h on fibronectin 10 μ g/ml. Scale bar represents 10 μ m. Then YAP (red) was immunostained for the analysis of its subcellular localization.

F. Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio, n>50 cells, represented in a logarithmic scale. $\beta 1^{ff}$ a□□ $\beta 1^{ff}$ expressing NF2^{BB} were spread on fibronectin (10 μ g/ml) in the absence or presence of IPA3, then stained for YAP. (***: p<0,0001; ns: not significant).

Figure 6. Rac1 mediates $\beta 1$ -dependent YAP nuclear translocation in a merlin dependent manner.

A. Immunostaining of YAP (red) in $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts expressing or not eGFP-Rac1^{G12V}, eGFP-Cdc42^{G12V}, and eGFP-RhoA^{G14V}. Scale bar represents 10 μ m.

B. Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio, n>50 cells, represented in a logarithmic scale. Control (Ctl) $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ cells, or $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ cells stably expressing RhoA^{G14V} were spread on fibronectin (10 μ g/ml) and YAP subcellular localization was analyzed. (ns: not significant)

C. Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio, n>50 cells, represented in a logarithmic scale. Control (Ctl) $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ cells or $\beta 1^{-/-}$ cells stably expressing Rac1^{G12V}

were spread on fibronectin (10 μ g/ml) and YAP subcellular localization was analyzed. (***: P < 0,0001; ns: not significant).

D. Western blot analysis of YAP, YAP^{PS127}, PAK and PAK^{P423} in $\beta 1^{ff}$, $\beta 1^{-/-}$ and $\beta 1^{-/-}$ expressing Rac1^{G12V}. Actin was used as loading control.

E. Cell proliferation quantification using EdU incorporation assay in control (Ctl) $\beta 1^{ff}$, $\beta 1^{-/-}$ cells or $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ expressing Rac1^{G12V} (Rac1*).

F. Quantification of cells displaying YAP staining in ruffles at different time points during cell spreading on fibronectin coated at 10 μ g/ml in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{ff}$ cells expressing Rac1^{G12V}.

G. $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{ff}$ cells stably expressing the NF2^{BB} mutant were left untreated (Ctl) or treated with the Rac inhibitor (EHT1864; 5 μ M) for 30 min. in suspension and then allowed to spread 1h on fibronectin 10 μ g/ml. Then YAP (red) was immunostained for the analysis of its subcellular localization. Scale bar represents 10 μ m.

H. Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio, n>50 cells, represented in a logarithmic scale. $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{ff}$ expressing NF2^{BB} were spread on fibronectin (10 μ g/ml) in the absence or presence of ETH1864, then stained for YAP. (***: p<0,0001; ns: not significant).

Figure 7. $\beta 1$ integrins are required for proper Rac1 targeting to the cell edges via p18/Lamtor positives vesicles

A. Left panel: Immunostaining of endogenous Rac1 (green) in $\beta 1^{ff}$ or $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts Scale bar represents 10 μ m. Arrows indicate ruffles formation in which Rac1 accumulates. Right panel: line profile analysis illustrating Rac1 distribution from the cell edge to the nucleus.

- B.** Distribution of p18/LAMTOR in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts. Cells were transfected with eGFP-p18 (green). Images were acquired using confocal microscopy. Scale bar represents 10 μ m.
- C.** Distribution of p18/LAMTOR during cell spreading. $\beta 1^{ff}$ osteoblasts were transfected with eGFP-p18 and then spread on fibronectin coated slides for 15, 30, and 120 minutes. p18/LAMTOR distribution was analyzed using GFP fluorescence within an optical slice using the Apotome mode of an epifluorescence microscope (Carl Zeiss). Scale bar represents 10 μ m.
- D.** Distribution of p18/LAMTOR in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts. Cells were transfected with eGFP-p18 (green) and stained for endogenous Rac1 (red). Scale bar represents 10 μ m.
- E.** Immunostaining of endogenous p18/LAMTOR (red) and Rac1 (green) in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts. Scale bar represents 10 μ m.
- F.** Coimmunoprecipitation of endogenous p18/LAMTOR with GFP-Rac^{G12V} (using a GFP epitope) in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts stably expressing GFP-Rac^{G12V}.
- G.** Coimmunoprecipitation of endogenous Rac1 with GFP-p18/LAMTOR (using a GFP epitope) in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts stably expressing GFP-p18/LAMTOR.

Figure 8. Lack of microtubule targeting to the plasma membrane is associated with a defective DRM vesicle trafficking in $\beta^{-/-}$ deficient cells.

- A.** Immunostaining of microtubules (anti α -tubulin) and actin (TRITC-phalloïdin) in $\beta 1^{ff}$, $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts treated for 1h with TSA (10 μ g/ml). Scale bar represents 10 μ m.
- B.** Western blot analysis of acetylated tubulin on lysine 40 and total tubulin in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ (with or without TSA treatment) osteoblasts. Actin is used as loading control.

- C. Analysis of p18/LAMTOR distribution by confocal imaging. Microtubules are visualized after immunostaining of α -tubulin (red) and p18 by following eGFP fluorescence (green). Fluorescence intensity correlation was performed to visualize and quantify the co-localization.
- D. Localization of eGFP-P18/LAMTOR in $\beta 1^{-/-}$ cells treated or not with TSA (10 μ M) for 1 hour.
- E. Time frame isolated from time lapse video microscopy of eGFP-18/LAMTOR transfected $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{-/-}$ osteoblasts. Time lapse is 10 sec. Vesicles were detected using local thresholding using Image J WCIF plugin. Three consecutive frames have been colored in green, red, and blue, respectively, to visualize p18 dynamics. Immobile vesicles during the 20 seconds time frame appear in white.

Figure 9. Microtubules dependent vesicular trafficking is required for YAP nuclear translocation.

- A. Western blot analysis of LATS, LATS^{S909}, YAP, and YAP^{S127}, in $\beta 1^{ff}$ (with or without primaquine treatment, 50 μ M, 1 hour) and $\beta 1^{-/-}$ cells. Actin was used as loading control.
- B. Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio in $\beta 1^{ff}$ cells pretreated with primaquine (50 μ M) or dynasore (0.9mM) in suspension and allowed to spread 1h on fibronectin (10 μ g/ml) with the drugs. n>50 cells, represented in a logarithmic scale. (***: p<0.0001)
- C. Statistical analysis of YAP nuclear to cytoplasm ratio in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{ff}$ expressing Rac1^{G12V} cells pretreated with nocodazole (10 μ M) 30 min. in suspension and then 1h

allowed to spread on fibronectin (10 μ g/ml) in the presence of the drug. n>50 cells, represented in a logarithmic scale. (***: P<0.0001; ns : not significant).

D. Immunostaining of YAP (red) and α -tubulin (green) in $\beta 1^{ff}$ cells after 1h of spreading on fibronectin (10 μ g/ml) with or without nocodazole treatment (10 μ M). Scale bar represents 10 μ m

E. Double staining of YAP (red) and α Tubulin (green) at different time points of adhesion on fibronectin. YAP accumulation into the nucleus correlates with microtubules targeting to ruffles. Scale bar represents 10 μ m.

F. Immunostaining of YAP (red) in $\beta 1^{ff}$ and $\beta 1^{ff}$ expressing Rac1^{G12V} cells treated with nocodazole (10 μ M) 30 min. in suspension and then allowed to spread for 1 hour on fibronectin (10 μ g/ml). Scale bar represents 10 μ m.

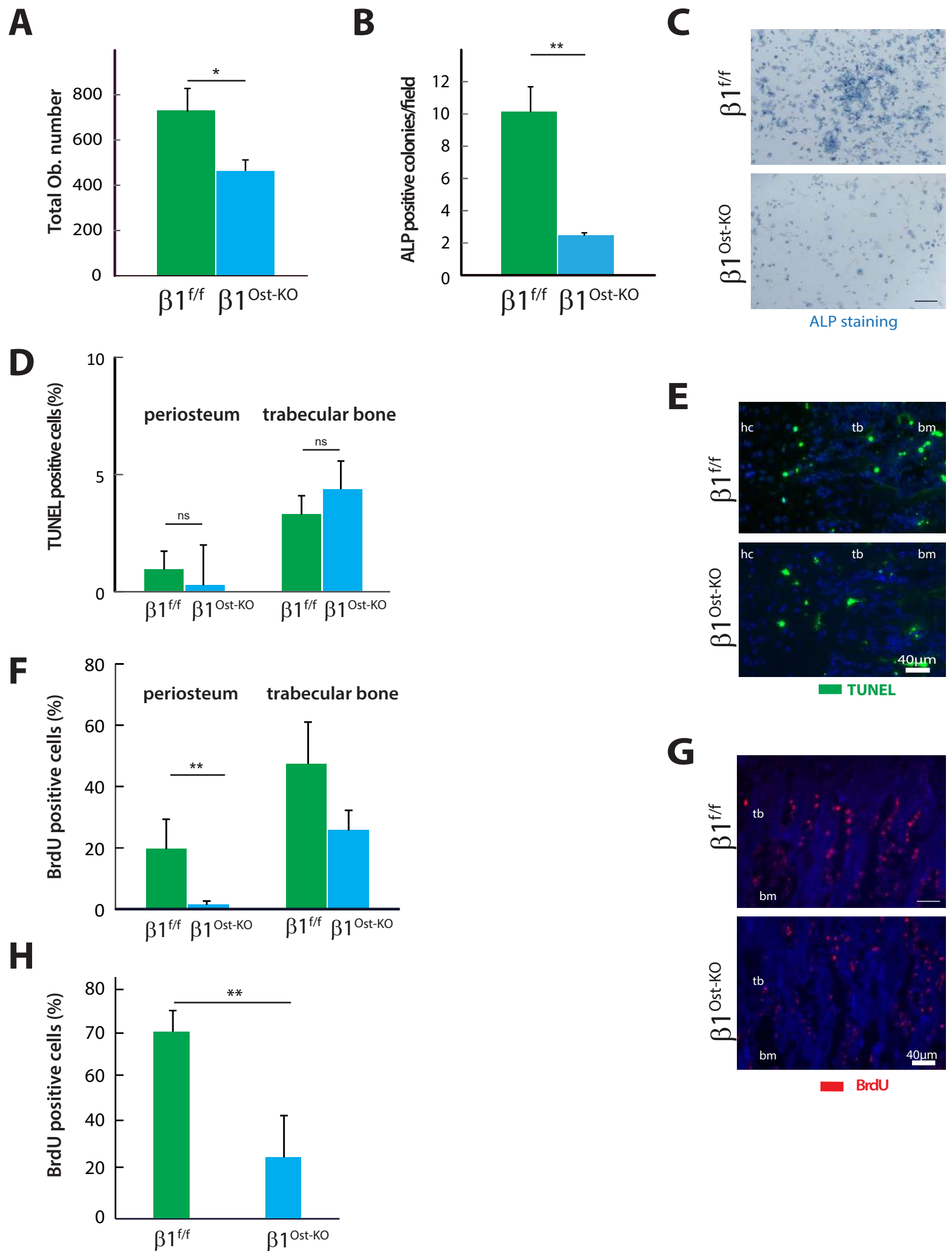


Figure 1

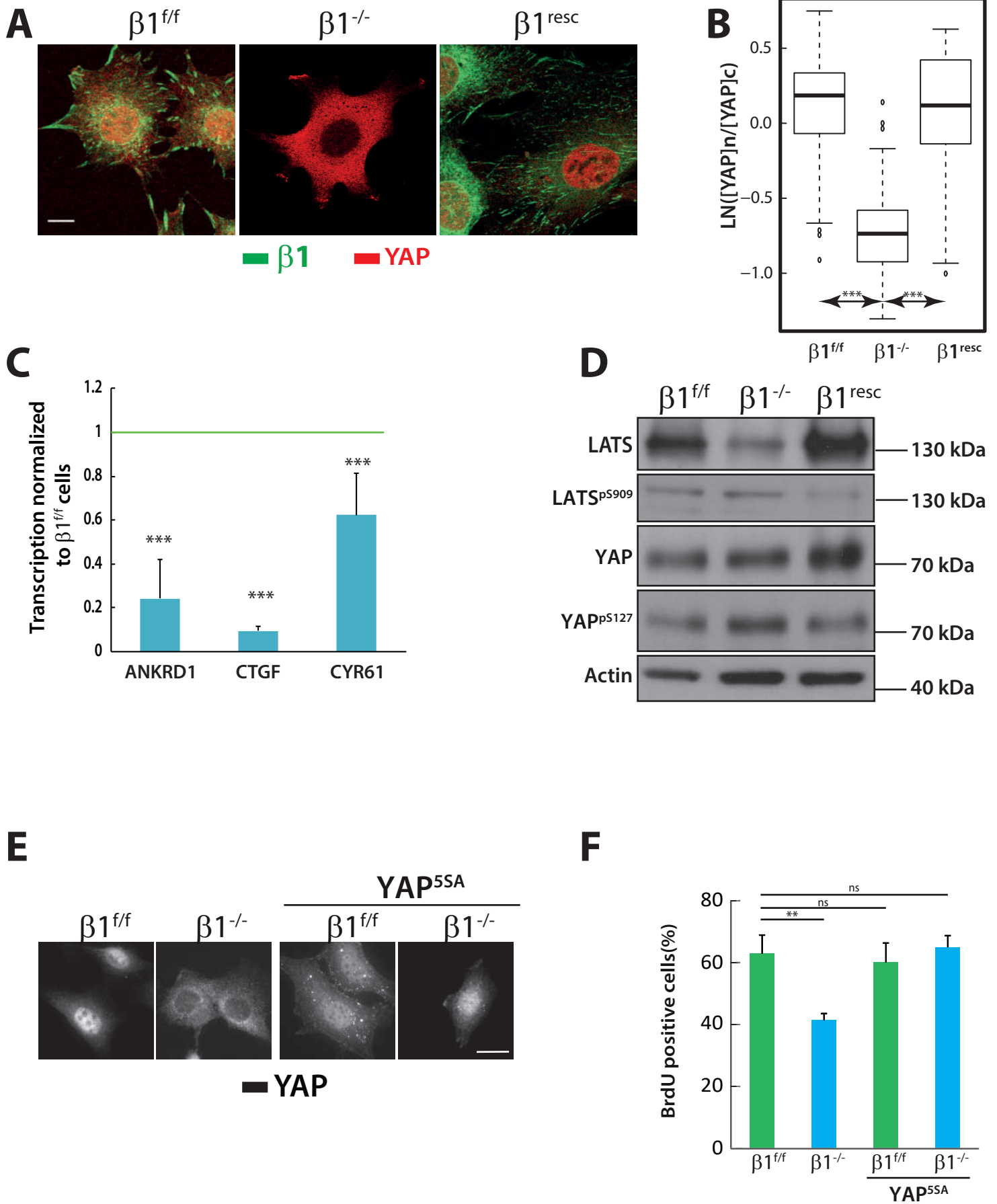


Figure 2

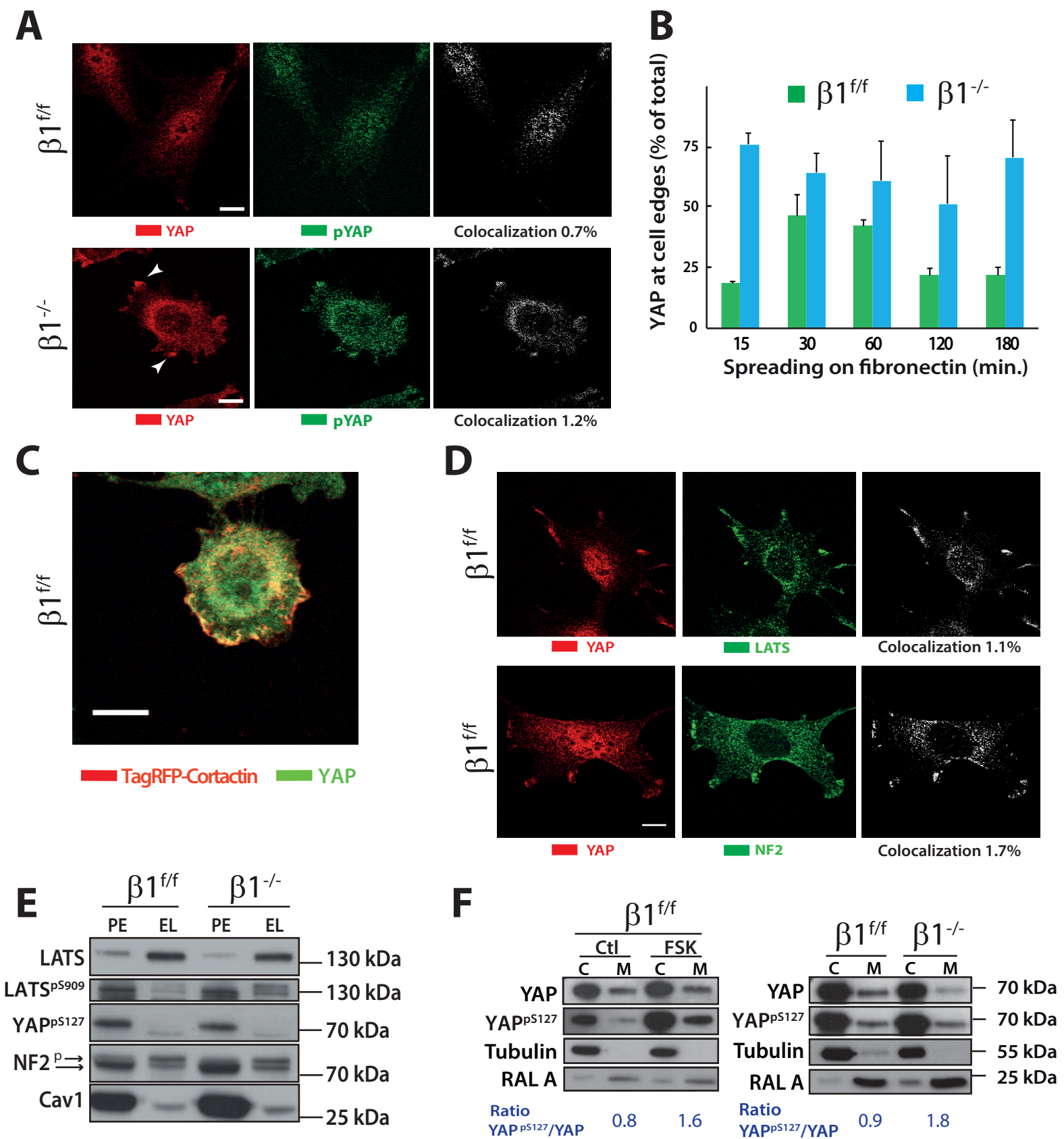


Figure 3

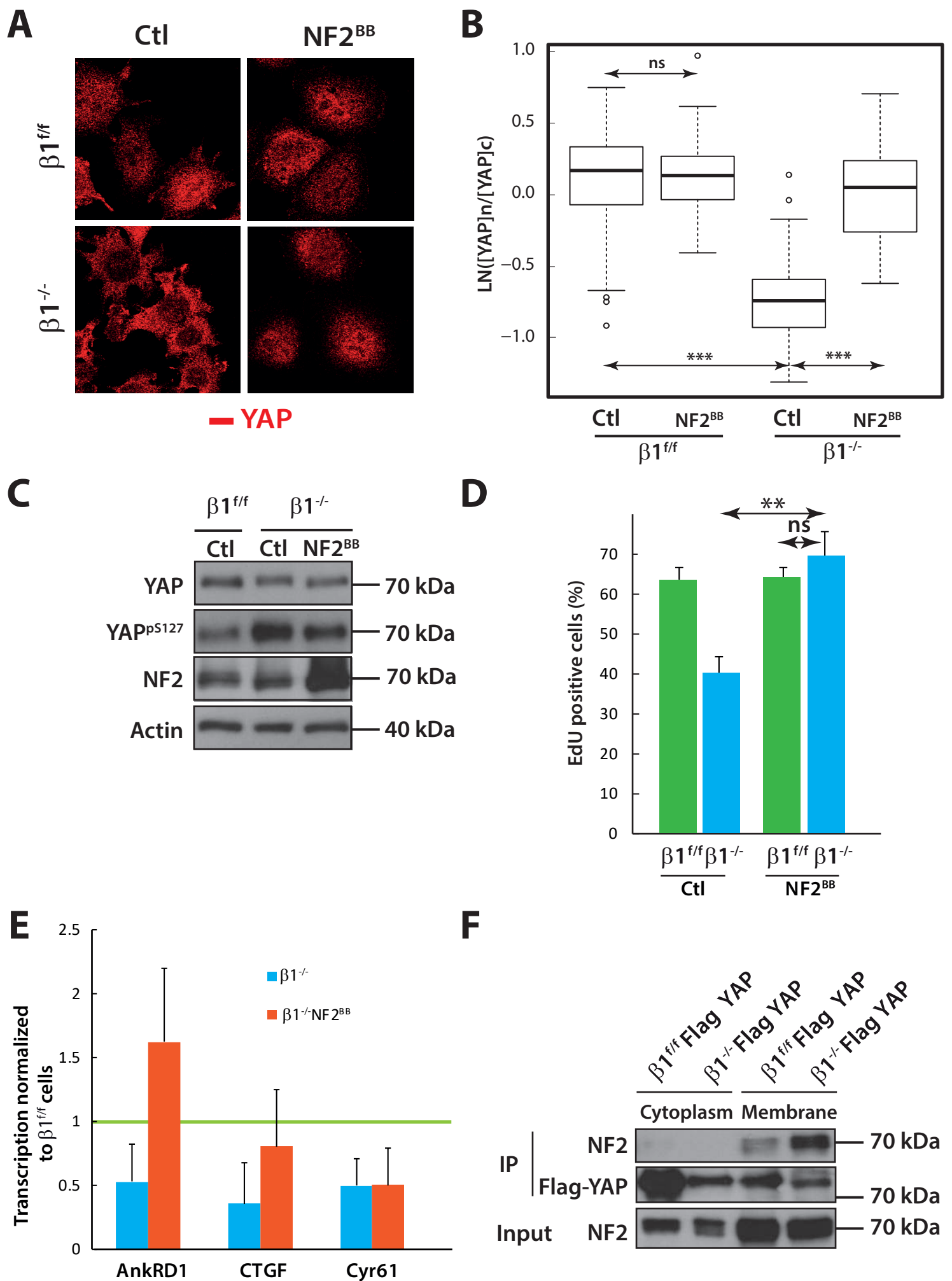


Figure 4

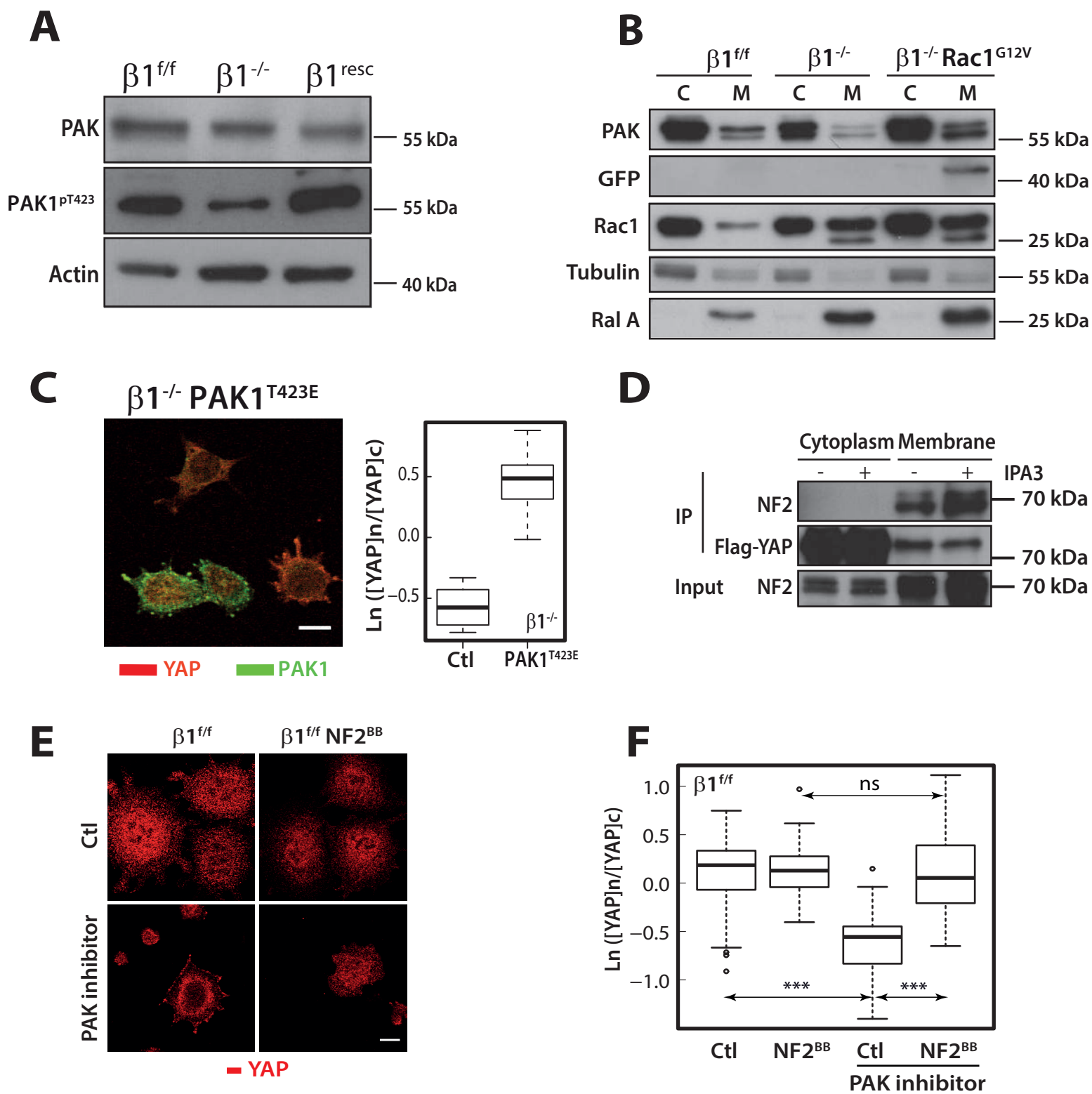


Figure 5

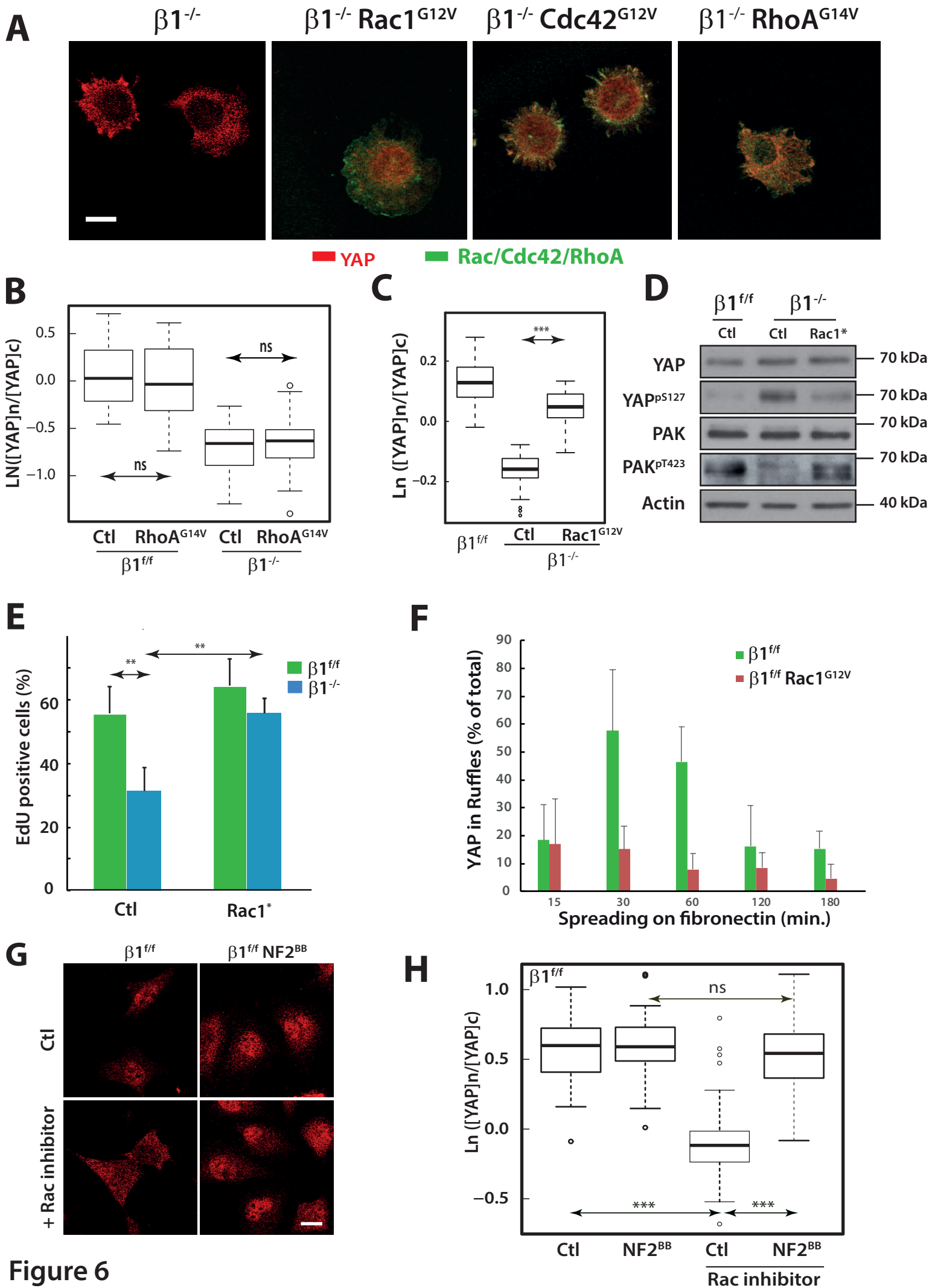


Figure 6

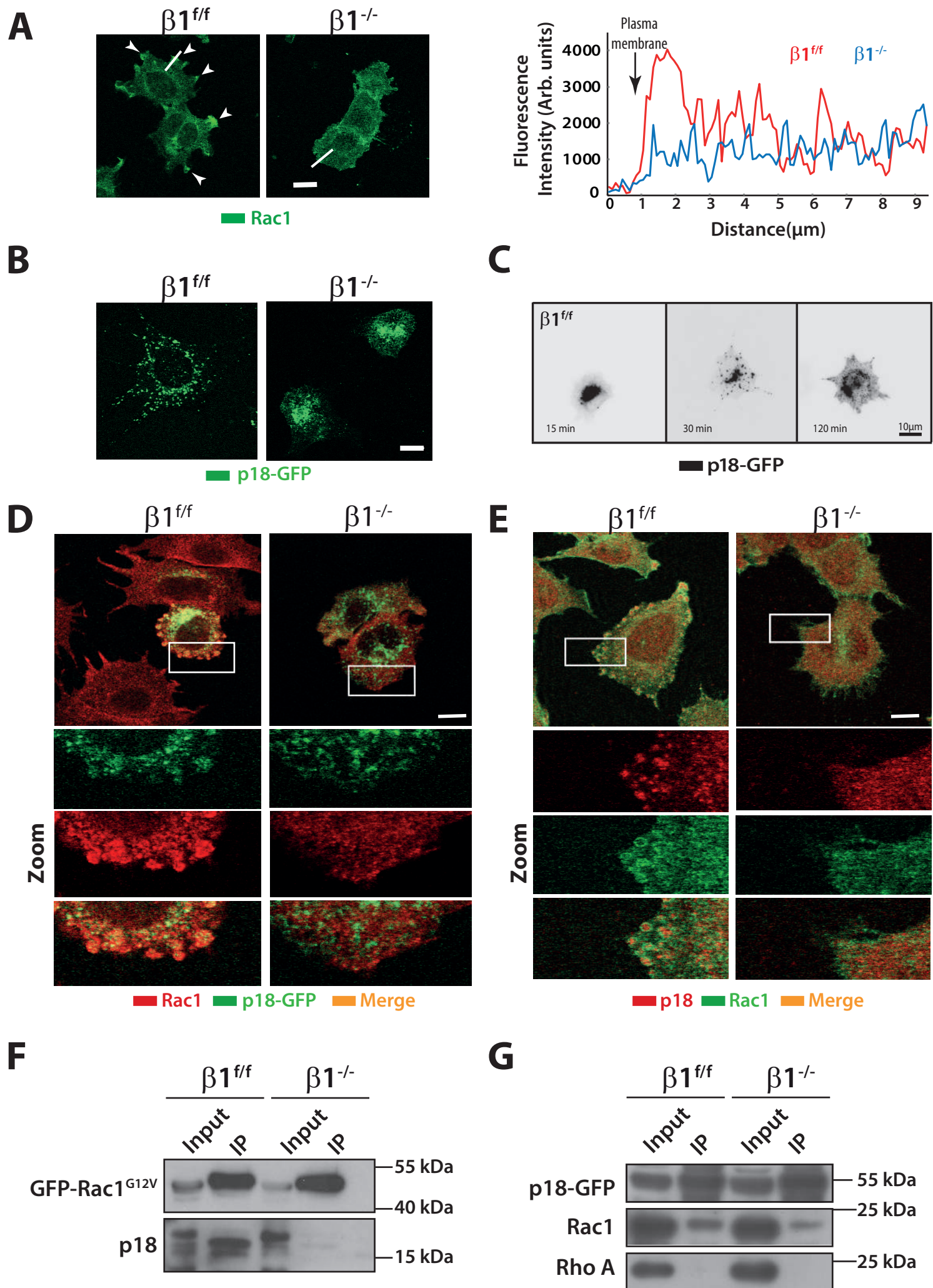


Figure 7

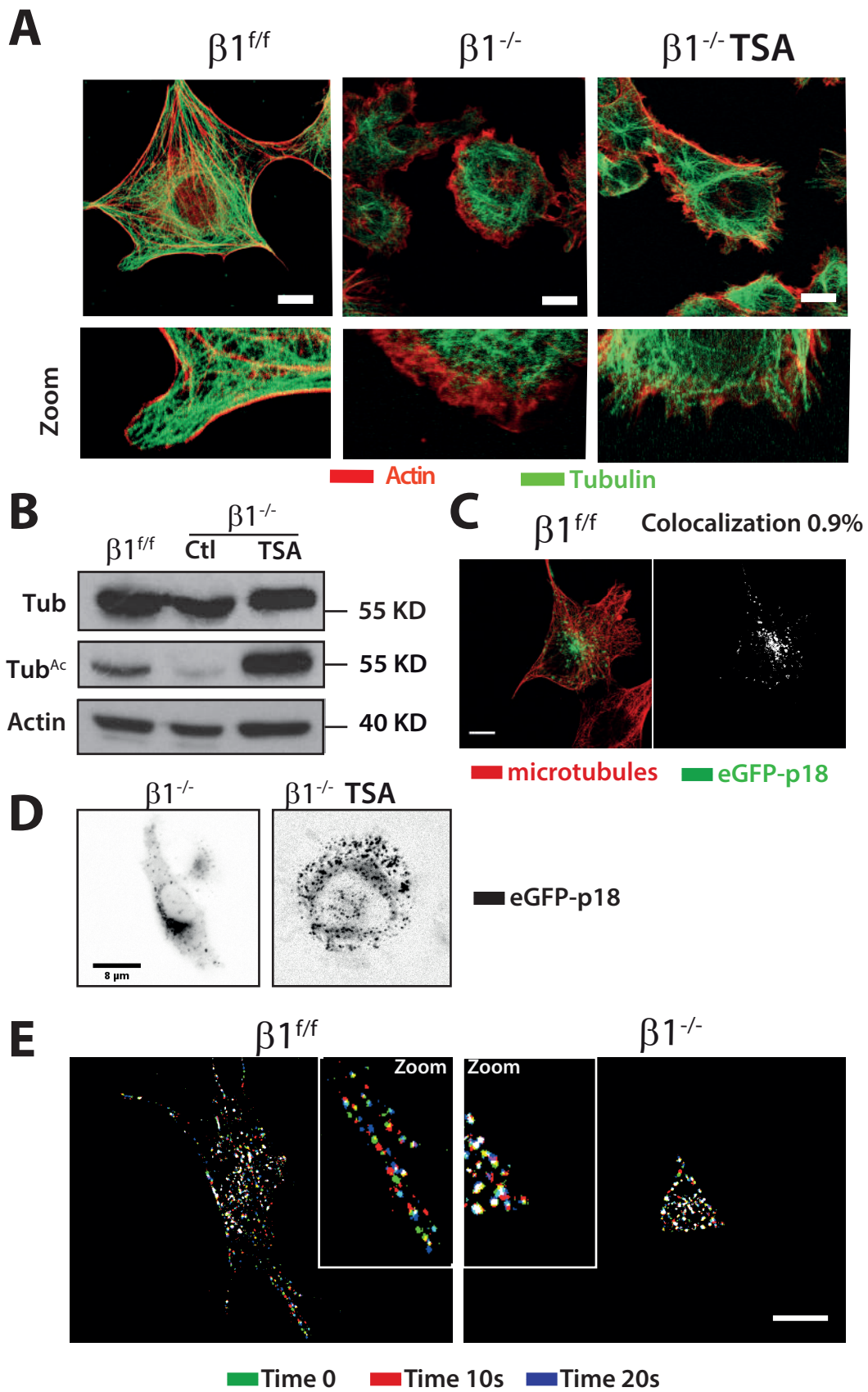


Figure 8

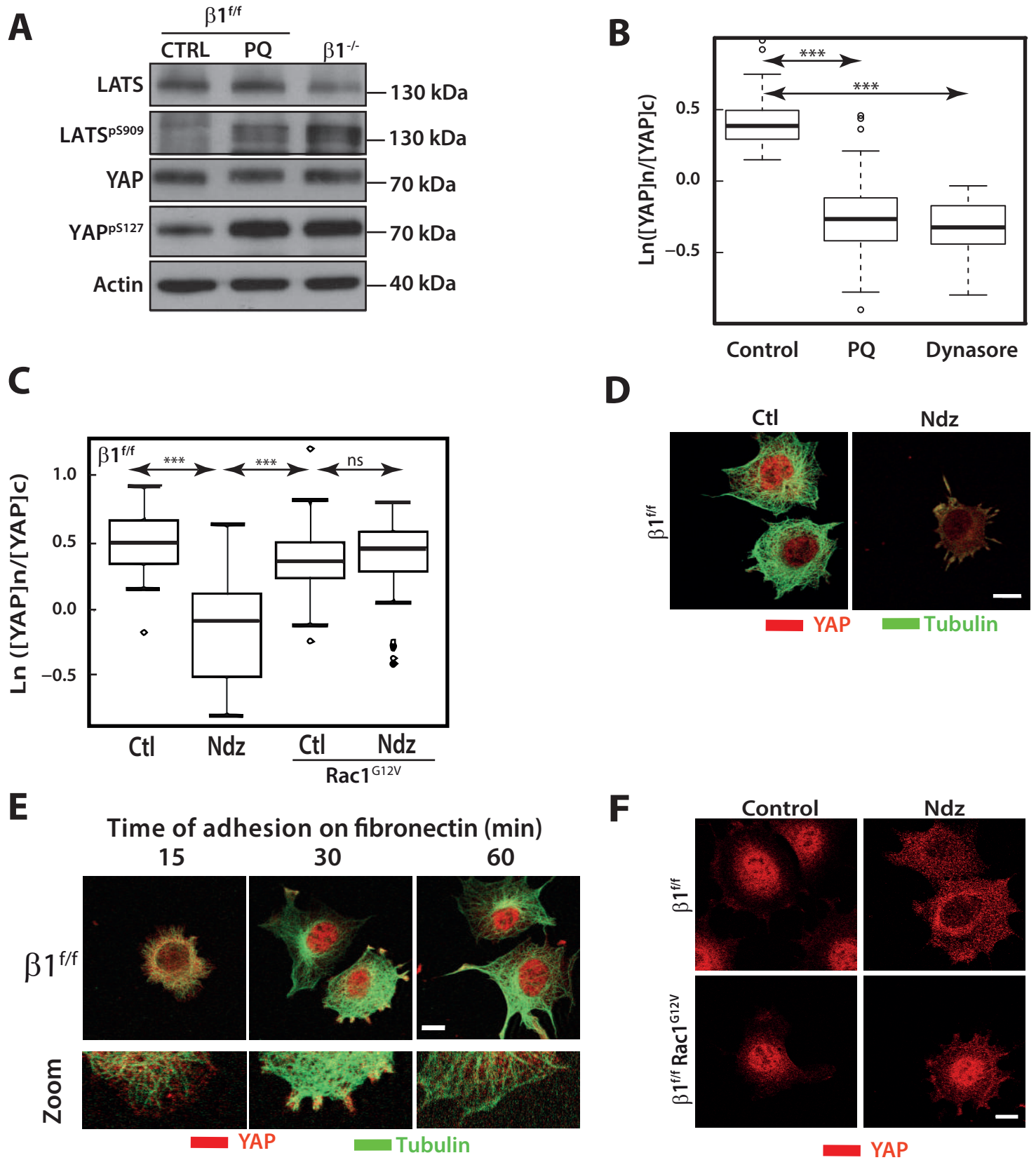


Figure 9

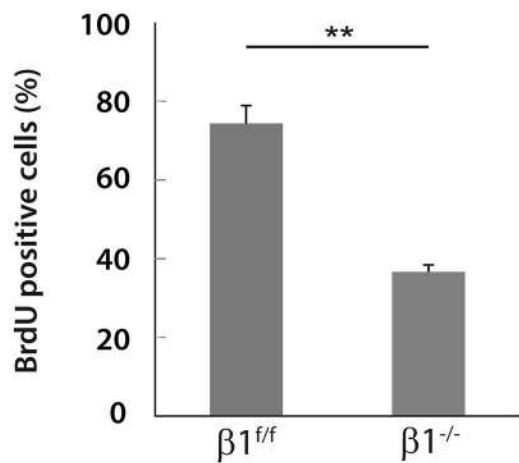
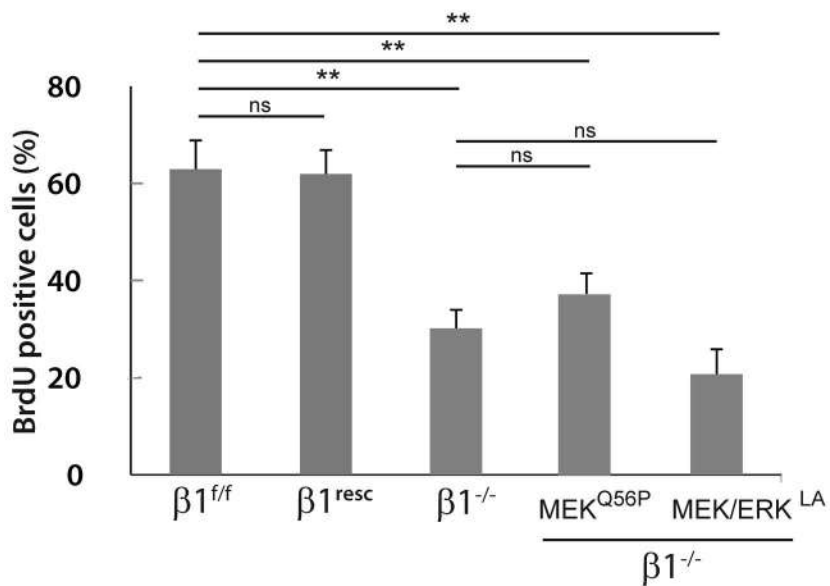
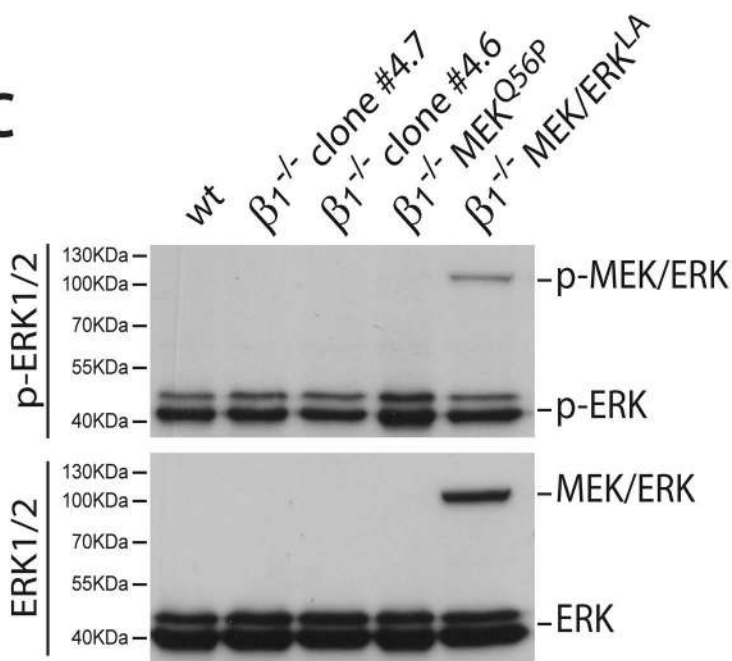
A**B****C**

Figure S1

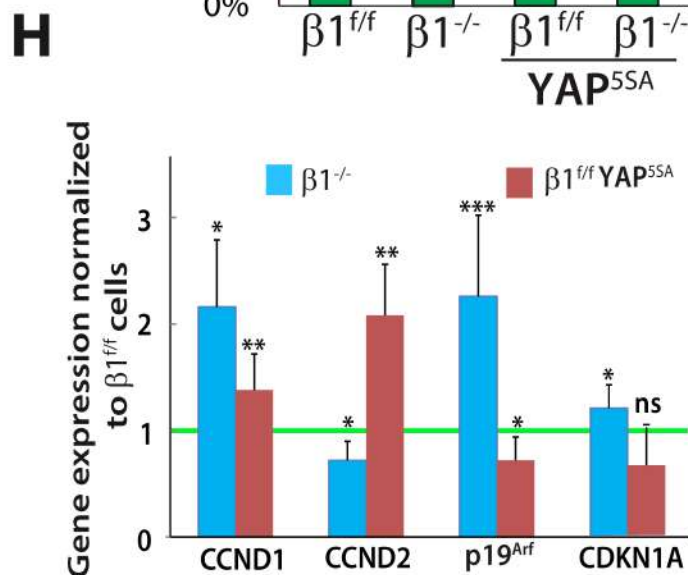
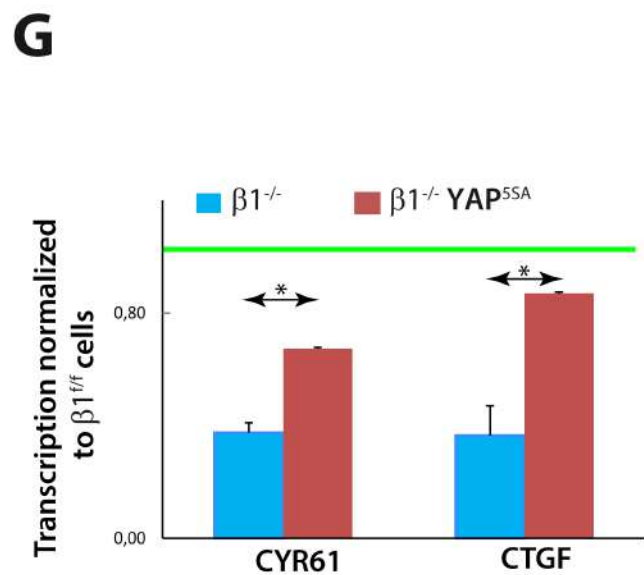
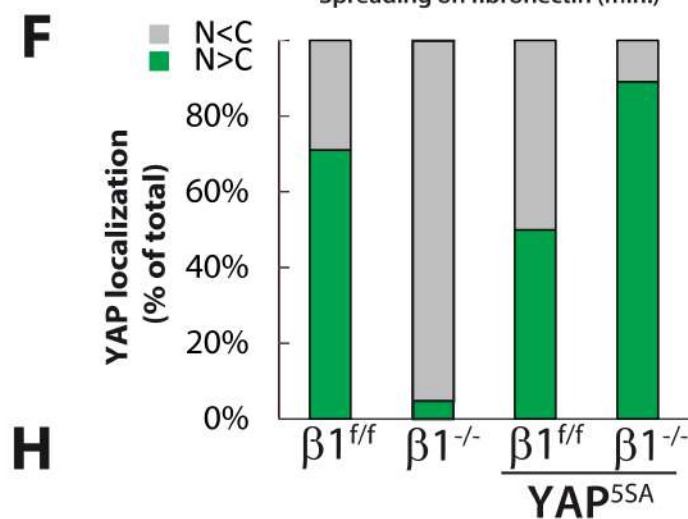
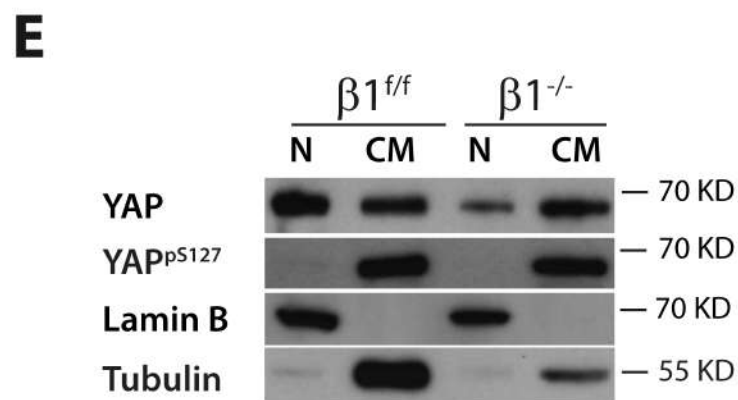
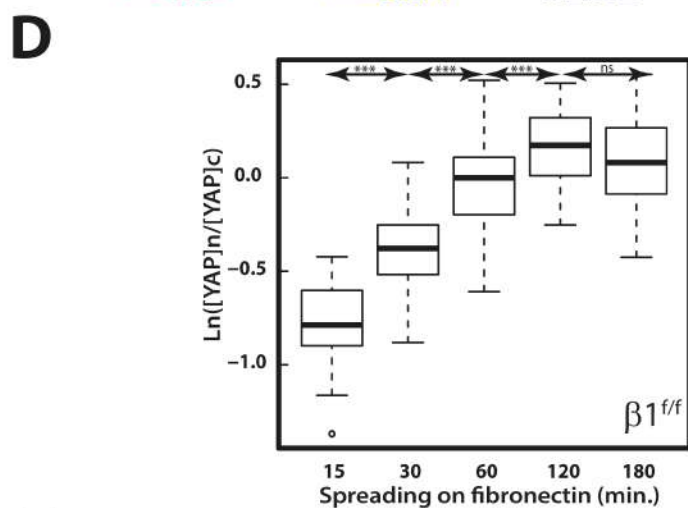
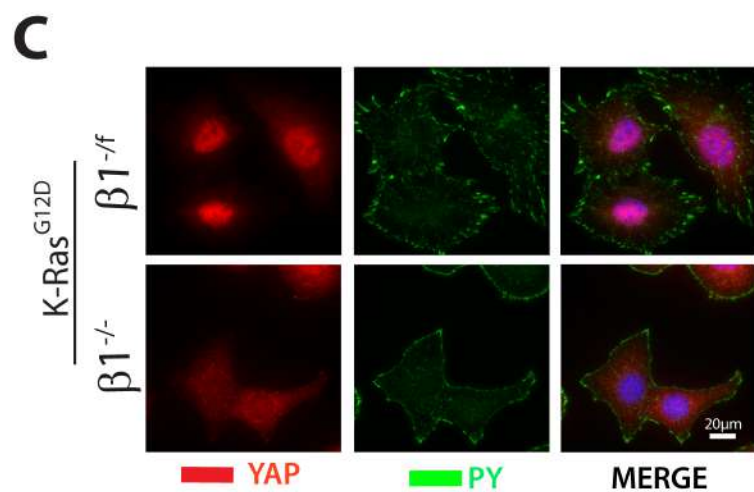
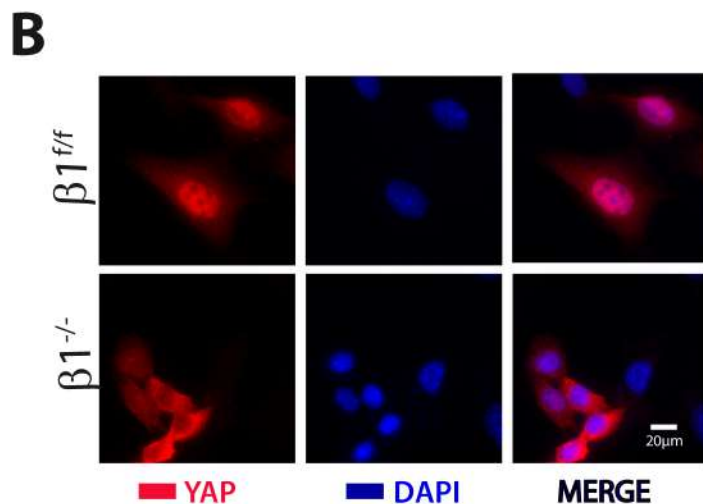
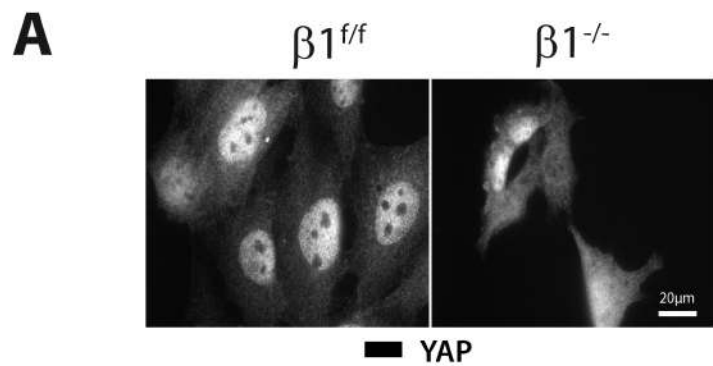
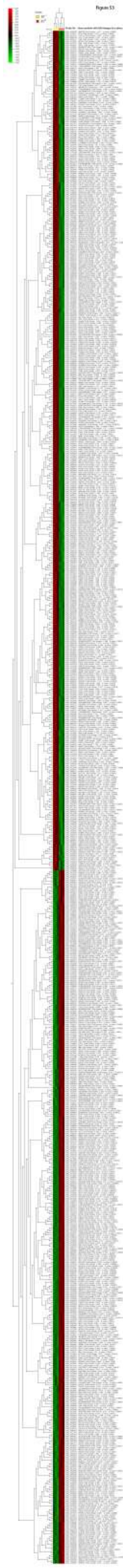


Figure S2



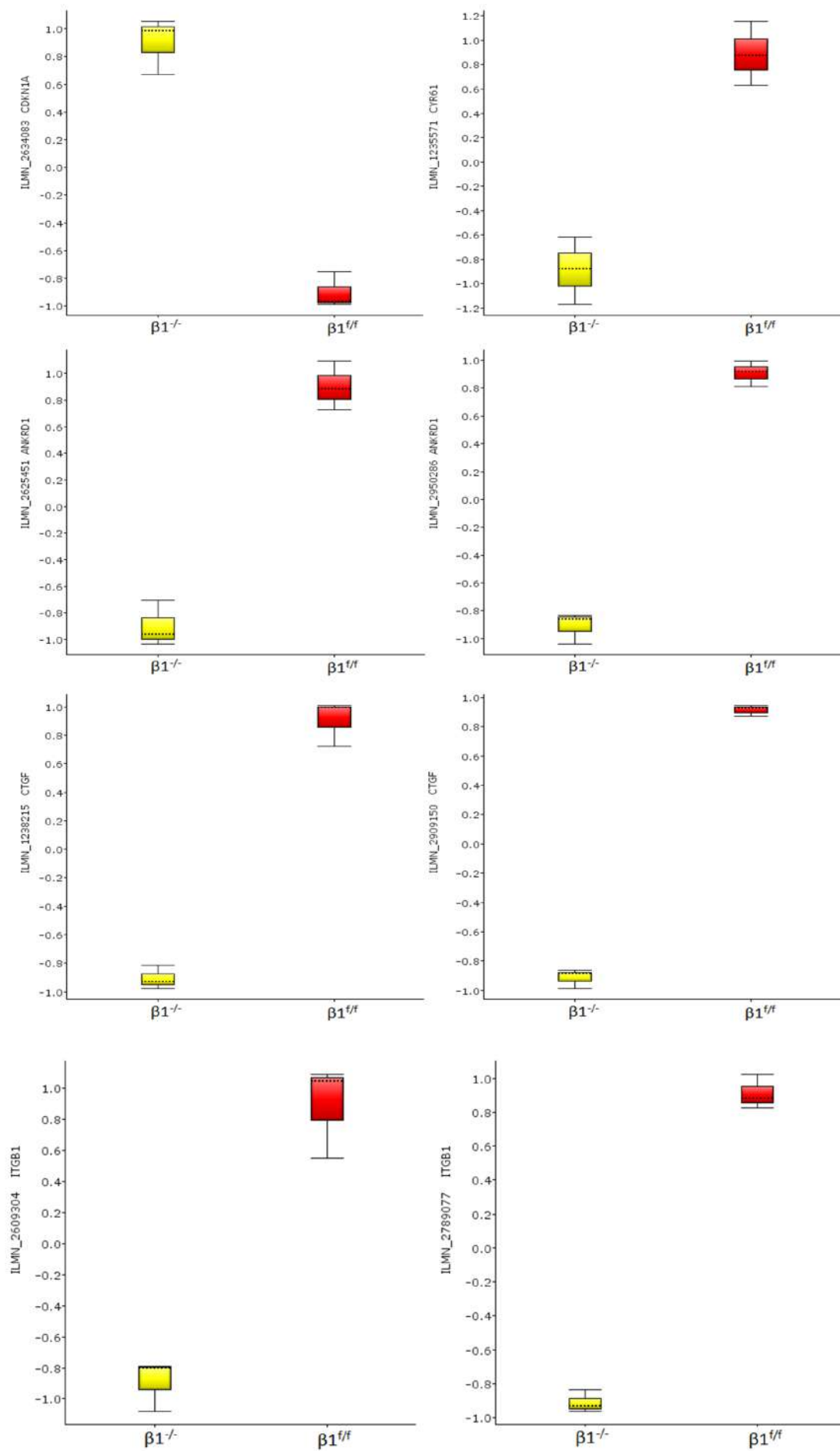


Figure S4

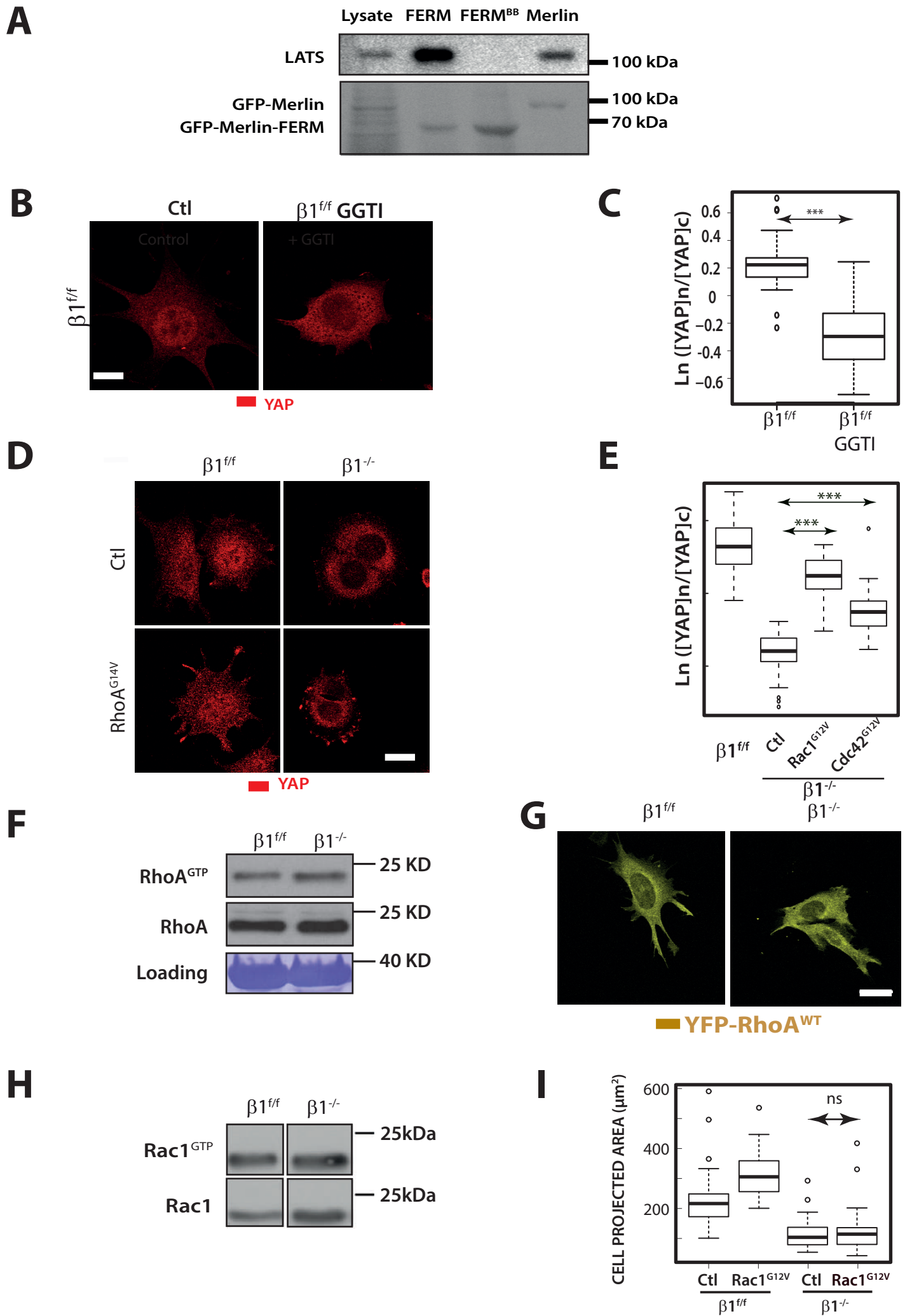


Figure S5

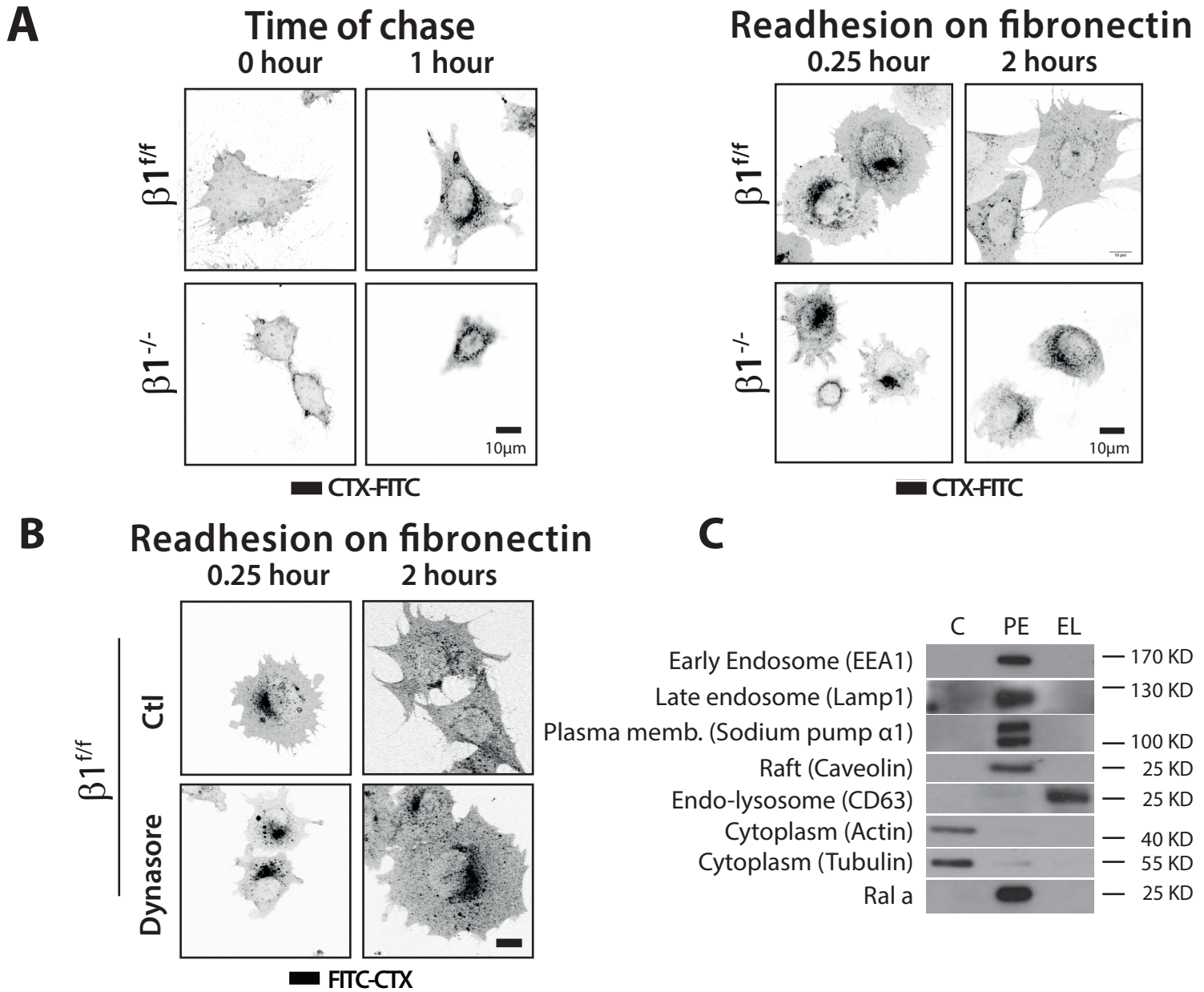


Figure S6

Chapitre 3: Discussion

3.1 Les intégrines $\beta 1$ contrôlent la prolifération cellulaire

L'adhérence cellulaire comme condition préalable à la prolifération cellulaire a été depuis longtemps documentée. La perte de ce point de contrôle est une caractéristique de la transformation cellulaire lors de la tumorigenèse. Parmi les récepteurs d'adhérence cellulaire, les intégrines jouent un rôle critique dans le développement normal mais également dans des situations pathologiques [18] [136]. Bien que plusieurs travaux aient montré que les intégrines orchestrent le recrutement et le regroupement des facteurs de croissance à la membrane plasmique probablement via des protéines cytoplasmiques telles que FAK et Src, une image claire de la façon dont les intégrines sont impliquées dans ce processus est toujours absente. Dans ces travaux, nous avons montré que la délétion spécifique de l'intégrine $\beta 1$ dans les ostéoblastes de souris entraîne une réduction de leur nombre, de leur différenciation et de leur prolifération. La voie MAPK/ERK est connue pour son implication dans la prolifération cellulaire [137], cependant, l'activation de la voie ERK ne restaure pas la prolifération dans notre modèle cellulaire. Récemment, il a été montré que les intégrines ainsi que l'interaction cellule-matrice étaient des régulateurs de la voie de signalisation Hippo [78]. YAP est une protéine oncogénique qui s'accumule dans le noyau et se lie à différents facteurs de transcription tels que les TEADs, p75 et Runx2, et régule l'expression des gènes cibles afin de contrôler la prolifération, le devenir ou l'apoptose cellulaires. Nous proposons un mécanisme moléculaire par lequel les intégrines $\beta 1$ contrôlent la localisation nucléaire de YAP et donc la prolifération cellulaire. La perte d'intégrines $\beta 1$ est associée à un défaut de prolifération des ostéoblastes à la fois *in vivo* et *in vitro*. Une expression de la forme constitutivement active de YAP dans les cellules $\beta 1^{-/-}$ restaure le défaut de prolifération observé, ce qui suggère que la dérégulation de YAP pourrait expliquer les défauts dans les cellules déficientes en $\beta 1$. Ce modèle est conforté par les observations suivantes: La localisation nucléaire de YAP diminue dans les ostéoblastes $\beta 1^{-/-}$. Les kinases LATS1/2 qui phosphorylent YAP sont activées suite à la délétion des intégrines $\beta 1$, en accord avec une augmentation du phospho YAP et de la ségrégation de ce dernier dans le cytoplasme (Figure 3.1).

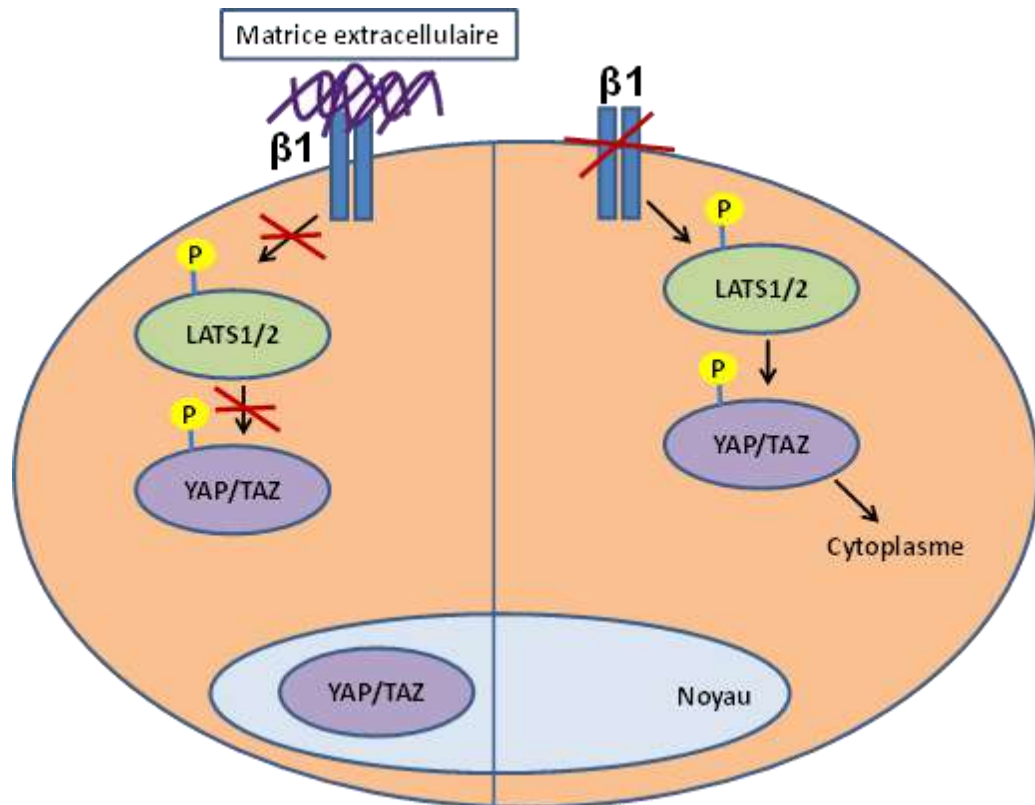


Figure 3.1 : Régulation de la localisation nucléaire de YAP par les intégrines $\beta 1$.

3.2 Les intégrines $\beta 1$ contrôlent YAP d'une façon Rac1 et PAK dépendante

Divers travaux indiquent que le cytosquelette d'actine régule l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ en contrôlant leur localisation nucléaire. D'autre part, le réarrangement du cytosquelette d'actine en réponse aux signaux mécaniques, tel que la rigidité de l'ECM, régule également l'activité de YAP/TAZ et induit la différenciation des MSCs en des lignées cellulaires spécifiques [70]. Malgré la quantité croissante des données supportant le rôle du cytosquelette d'actine dans la régulation de l'activité YAP/TAZ, le mécanisme moléculaire est toujours élitif. Les Rho GTPases sont des régulateurs majeurs de l'organisation du cytosquelette. Ils régulent également l'activité de YAP. Bien que RhoA et Rac1 aient généralement des effets antagonistes, elles convergent toutes les deux dans l'activation de la LIM kinase (LIMK). RhoA active LIMK via son effecteur majeur ROCK, tandis que Rac1 stimule cette kinase via PAK. L'activation de la LIMK induit la phosphorylation et l'inactivation de la cofiline (une protéine qui déstabilise l'actine filamenteuse) favorisant ainsi la polymérisation de l'actine et l'accumulation des filaments d'actine [138] [139]. Cette

accumulation favorise l'activité de YAP. De plus, il a été décrit que l'adhérence des cellules entraîne dans un premier temps l'activation de Cdc42 et la formation des filopodes et dans un deuxième temps, l'activation de Rac1 et la formation des lamellipodes. Lors de l'adhérence cellulaire, Rac1 est transloqué à la membrane plasmique. En revanche, dans les cellules en suspension, Rac1 se retrouve dans les compartiments internes. Bokoch et al ont montré que lors de l'étalement des fibroblastes, l'activation de Rac1 et de Cdc42 est médiée par les intégrines [140]. La liaison de Rac1 et Cdc42 à PAK est nécessaire pour l'activation de celle-ci ainsi que la formation des lamellipodes et des filopodes. Au vu de ces données, nous avons voulu analyser les mécanismes moléculaires liant les intégrines, la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'activation des Rho GTPases.

Nous avons montré que la localisation nucléaire de YAP peut être restaurée dans les cellules $\beta 1^{-/}$ par l'expression de la forme activée de Rac1, mais non pas par la forme activée de RhoA. Nos données actuelles soutiennent un rôle de Rac1 dans ce processus. Nos résultats concordent avec les résultats de Matsumoto et al qui ont montré qu'Arl4c déclenche la translocation nucléaire YAP en augmentant l'activité de Rac1 et en bloquant l'activité de RhoA [141]. En outre, nous avons montré que l'intégrine $\beta 1$ est nécessaire à l'activation de PAK1, et que PAK1 restaure la localisation nucléaire de YAP dans les cellules $\beta 1^{-/}$ (Figure 3.2). Bien que dans notre modèle RhoA ne semble pas impliquée, en contradiction avec certains autres travaux, nous ne pouvons pas exclure que cette GTPase puisse contrôler la voie Hippo dans d'autres processus ou d'autres types cellulaires.

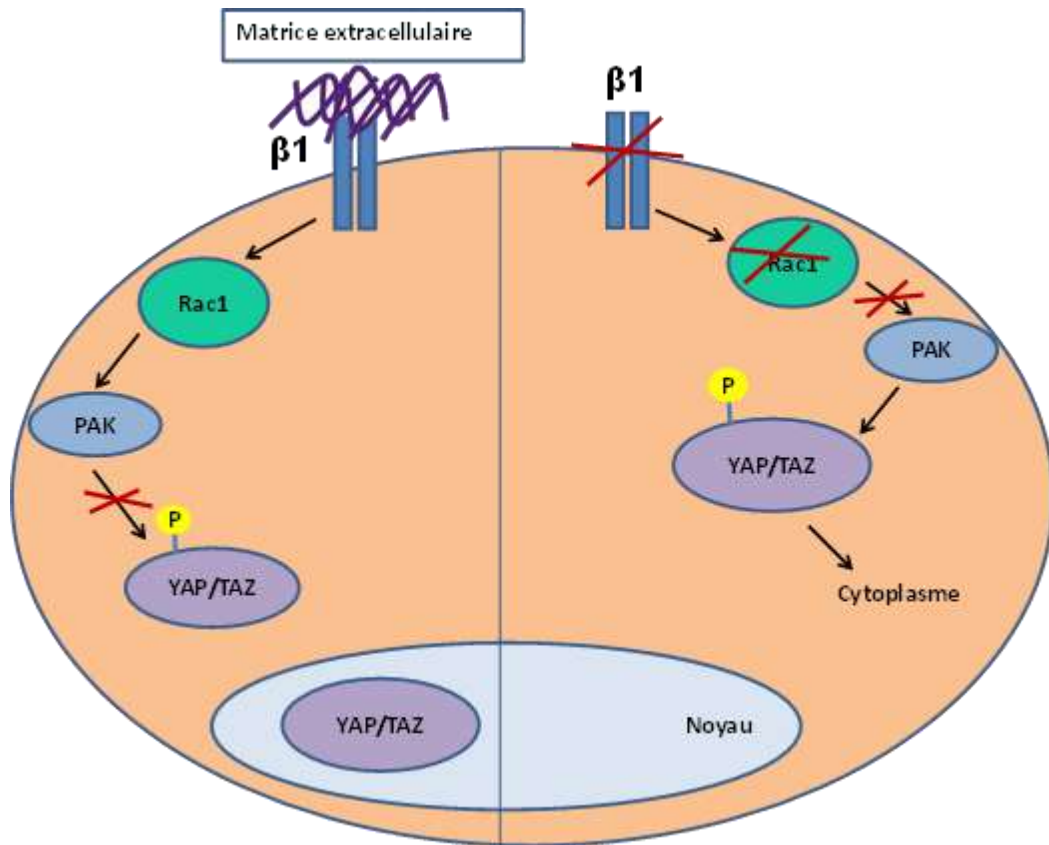


Figure 3.2 : La localisation nucléaire de YAP est contrôlée par la voie Rac1/PAK.

3.3 Le trafic DRM/Rac1 vers la membrane plasmique est contrôlé par l'engagement des intégrines $\beta 1$

Il a été montré que Rac1 est activé au niveau des « early endosomes » et retourne à la membrane plasmique d'une manière microtubule dépendante [142]. Rac1, comme la plupart des protéines de la famille Rho sont des substrats de la géranylgeranyl transférase I. L'association du groupement géranylgeranyl au niveau de la boîte CAAX est indispensable pour sa translocation au niveau des membranes [143]. Cette modification favorise son recrutement sur les membranes résistantes aux détergents (DRM). Nous et d'autres groupes ont montré que le blocage pharmacologique de l'addition du fragment géranylgeranyl interfère efficacement avec la localisation nucléaire du YAP [144]. Nos travaux actuels montrent que le retour de vésicules DRM au niveau de la membrane plasmique est intégrine $\beta 1$ dépendant. En utilisant le marqueur spécifique des DRM, le p18/LAMTOR, on a montré que la distribution des vésicules DRM est dépendante de l'adhérence cellulaire médiée par les intégrines $\beta 1$. De plus, Rac1 est associé avec les vésicules p18/LAMTOR. Récemment,

LAMTOR associé aux vésicules, a été montré comme étant ciblé sur les adhérences focales où il régule leurs dynamiques [145].

3.4 Le défaut du trafic Rac1/DRM dans les cellules $\beta 1^{-/-}$ est dû au défaut de ciblage des microtubules

Il est démontré que les Rho GTPases pourraient affecter le trafic des membranes par l'organisation du cytosquelette d'actine. L'acide lysophosphatidique (LPA), qui est bien caractérisé pour sa capacité à activer RhoA conduisant à la formation de fibres de stress, induit également une stabilisation des microtubules [146]. La stabilisation des microtubules en réponse à l'acide lysophosphatidique n'a pas d'effets clairs, mais il est possible qu'elle entraîne un trafic plus rapide des vésicules membranaires [147]. La vidéo microscopie que nous avons réalisée montre que le trafic des vésicules p18 positives (DRMs) est ralenti dans les cellules déficientes en $\beta 1$. La diminution de la tubuline acétylée laisse supposer qu'il existe un défaut de stabilisation des microtubules dans les cellules $\beta 1^{-/-}$. Elle est accompagnée d'un défaut de ciblage à la membrane plasmique des microtubules au niveau des protrusions cellulaires. Ce ciblage est essentiel pour la stabilisation et l'acétylation des microtubules où ils jouent un rôle actif dans la modulation de la dynamique d'adhérence focale [131]. Le double marquage de l'actine et de la tubuline, indique que les deux cytosquelettes sont étroitement interconnectés. En effet, les microfilaments sont capables de capturer les microtubules et de guider leur polymérisation en périphérie cellulaire.

La stabilisation des microtubules nécessite l'interaction des protéines de liaison du cortex cellulaire. Au niveau du cortex, l'ILK semble jouer ce rôle. Mécaniquement, l'ILK est nécessaire pour localiser IQGAP1 au niveau du cortex cellulaire, qui, avec mDia1, interagit avec les extrémités plus des microtubules et régule ainsi la stabilité. Par conséquent, l'instabilité des microtubules est accrue dans les cellules dépourvues d'ILK, IQGAP ou mDia1 [131]. En accord avec cela, l'expression d'une forme active de mDia (pour augmenter la polymérisation de l'actine dépendante des formines) est suffisante pour restaurer le défaut de ciblage des microtubules suite à la perte de l'association intégrines-ILK. Nos travaux montrent que la stabilisation des microtubules suite à l'inhibition des HDACs par la TSA restaure leurs ciblages en périphérie membranaire. Etant donné que les microtubules sont des voies importantes pour le trafic vésiculaire à longue distance, leurs mauvaises stabilités

et leurs défauts de ciblage dans les cellules déficitaires en intégrine $\beta 1$ ou lors du détachement des cellules, ralentit le retour des vésicules DRM donc de Rac1 au niveau de la membrane plasmique. L'absence de Rac1 augmente la stabilité d'un complexe inhibiteur comprenant NF2/LATS et YAP permettant ainsi la phosphorylation de YAP et sa séquestration cytoplasmique. Cette vue est confortée par notre observation que la perturbation du réseau des microtubules par le nocodazole empêchait l'accumulation nucléaire de YAP dépendante de l'adhérence dans les cellules contrôles. Cette inhibition pouvant être levée par l'expression d'une forme de Rac1 constitutivement active (Figure 3.3).

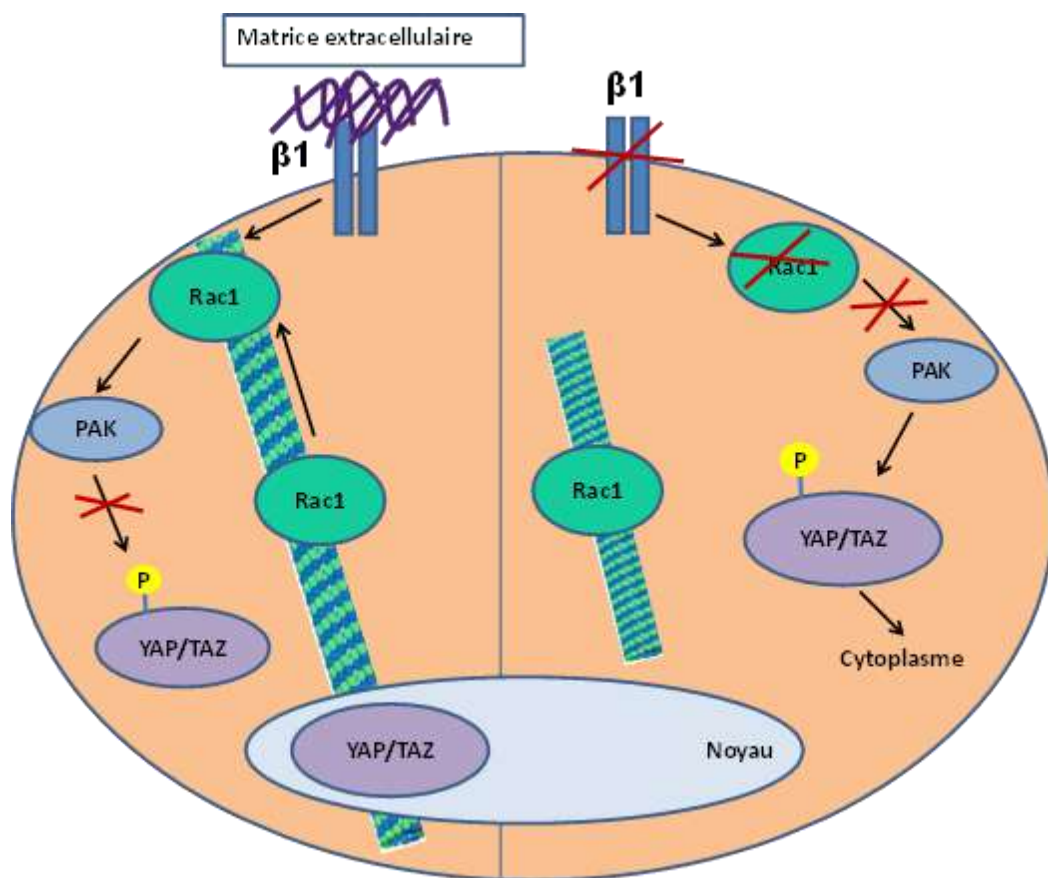


Figure 3.3 : Le transport membranaire de Rac1 via les microtubules régule l'activation de YAP/TAZ

3.5 Les intégrines $\beta 1$ contrôlent la prolifération cellulaire d'une façon NF2/merline dépendante

Une caractéristique essentielle des microtubules dans la performance des processus cellulaires variés est leurs capacités à remodeler en continu, un phénomène connu sous le nom d'instabilité dynamique. Il est donc concevable qu'une partie de la fonction normale de

certaines gènes cancérigènes soit de réguler l'instabilité dynamique des microtubules [148]. Les mutations du gène NF2 provoquent la neurofibromatose de type 2, un syndrome cancéreux caractérisé par le développement de tumeurs du système nerveux. Une caractéristique de NF2 est qu'elle se lie et stabilise les microtubules en abaissant les taux de polymérisation et de dépolymérisation. La perte des effets stabilisateurs des microtubules par NF2 pourrait expliquer, par exemple, le trafic altéré des vésicules [148].

La transition entre la conformation ouverte : domaine FERM accessible et la conformation fermée: domaine FERM inaccessible, contrôle la fonction suppresseur de tumeurs de la NF2/merline. La transition entre les deux conformations est modulée par la phosphorylation de la sérine 518. NF2 exerce son activité de suppression de tumeur par le biais de plusieurs voies distinctes, y compris l'activation de la voie Hippo. Sous sa forme déphosphorylée, NF2 est active. L'activation de NF2 stimule son interaction avec LATS et l'activation de celle-ci ce qui promeut la phosphorylation de YAP. Cependant, ce processus est encore mal défini. Dans notre étude, nous avons montré qu'il existe une interaction NF2/YAP au niveau de la membrane suggérant l'existence d'un complexe NF2/YAP/LATS. Le rôle de NF2 serait donc de rapprocher LATS de son substrat YAP. De plus, il a été décrit que l'inactivation de NF2 est contrôlée par l'action de Rac1, via sa kinase effectrice PAK. PAK phosphoryle NF2 sur la sérine 518. Dans notre étude, nous avons effectivement montré que l'activation de PAK par Rac1, inhibe l'interaction NF2/YAP, ce qui libère YAP du complexe. Récemment, il a été démontré que la phosphorylation de NF2 au niveau de la sérine 518 réduit son interaction avec les membres de la famille AMOT. Le recrutement d'AMOT au niveau de la merlin stabilise ce dernier dans une conformation ouverte ce qui permet à LATS de se lier au domaine FERM de NF2 et donc d'activer la voie Hippo [118] (Figure 3.4).

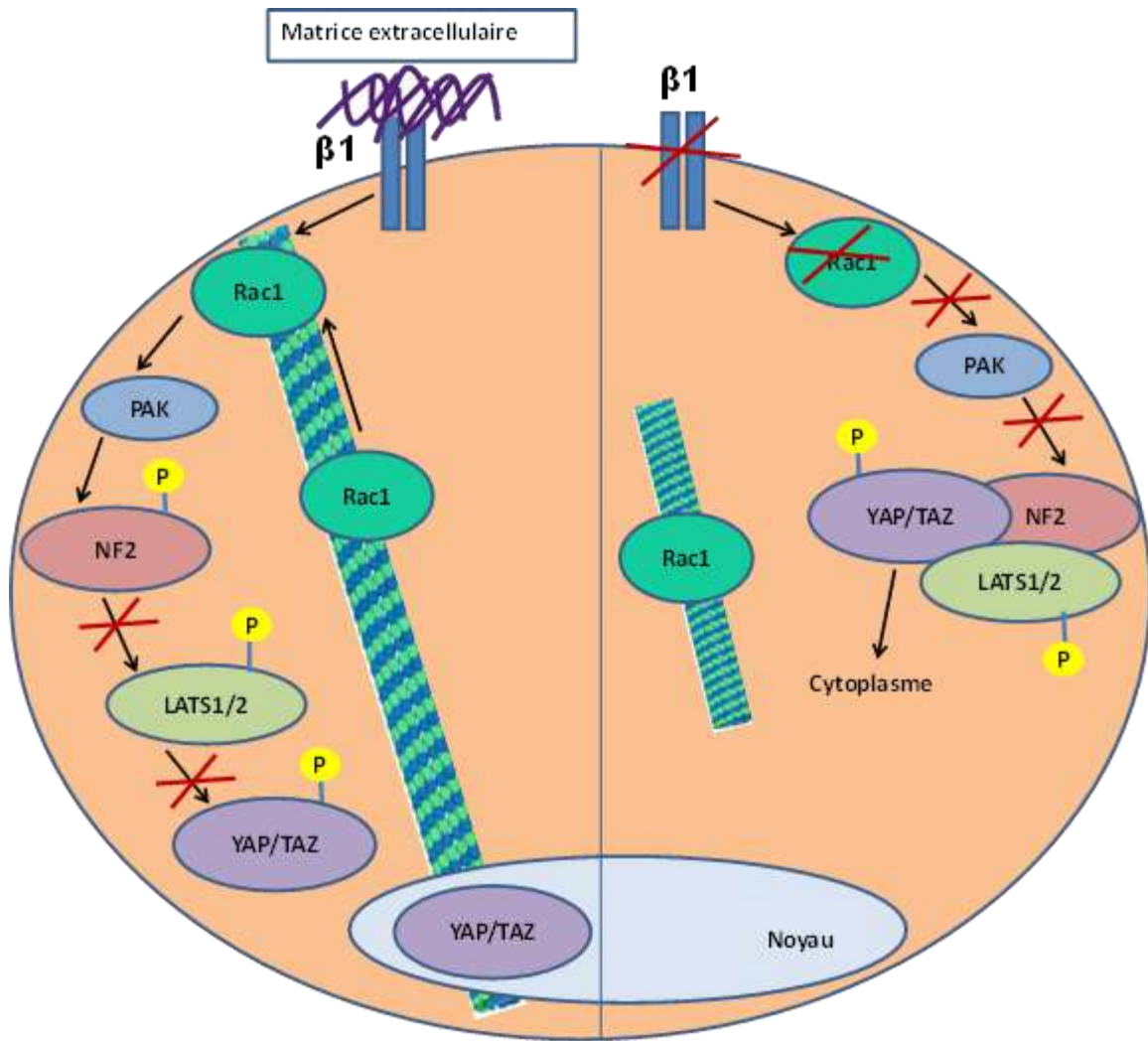


Figure 3.4 : La signalisation intégrine $\beta 1$ régule la localisation nucléaire de YAP en contrôlant l'activation Rac1/PAK/NF2. Processus microtubules dépendant.

Chapitre 4: Conclusion et perspectives

Nos travaux décrivent un mécanisme moléculaire par lequel les intégrines $\beta 1$ contrôlent la prolifération en régulant l'activité de YAP. Diverses questions restent encore sans réponses.

Comment YAP est-il déphosphorylé lors de sa libération de la membrane plasmique? Une hypothèse intéressante pourrait être que le pool cytoplasmique de YAP interagit avec protéine serine thréonine phosphatase PP2A comme déjà démontré dans la peau [149]. Sous sa forme phosphorylée, YAP interagit avec les protéines 14.3.3 et donc PP2A n'aurait pas d'accès au site de phosphorylation S127 reconnu par 14.3.3. En outre, il est probable qu'il existe une compétition entre TEAD et 14.3.3 pour interagir avec le phospho YAP. L'interaction de YAP avec TEAD au niveau respectivement de leurs domaines TBD (TEAD Binding Domain) et YBD (YAP Binding Domain), libère le site de phosphorylation S127 de YAP, ce qui laisse un libre accès à PP2A pour ce site et donc induirait l'activation de YAP (Figure 4.1).



Figure 4.1 : Schémas des séquences de YAP et TEAD. AD: Transcriptional activation domain, TEA: DNA-binding TEA domain, YBD: YAP-binding domain, TBD: TEAD binding domain, NLS: Nuclear localization signal, NES: Nuclear export signal.

YAP ne contient pas une séquence NLS (nuclear localization signal): comment YAP est-il accumulé dans le noyau? Puisque TEAD contient une séquence NLS, donc probablement YAP rentre dans le noyau sous forme d'un complexe YAP/TEAD (Figure 4.2). Le blocage de l'interaction YAP/TEAD par la vertéporfine empêche effectivement l'entrée de YAP dans le noyau. De plus, des résultats préliminaires montrent que suite à la délétion des intégrines $\beta 1$, une diminution du taux d'expression protéique de TEAD est observée. Une hypothèse expliquant cette observation pourrait être que l'interaction de YAP avec TEAD est importante pour la stabilité de ce dernier et que TEAD libre au niveau du cytoplasme est dégradé rapidement.

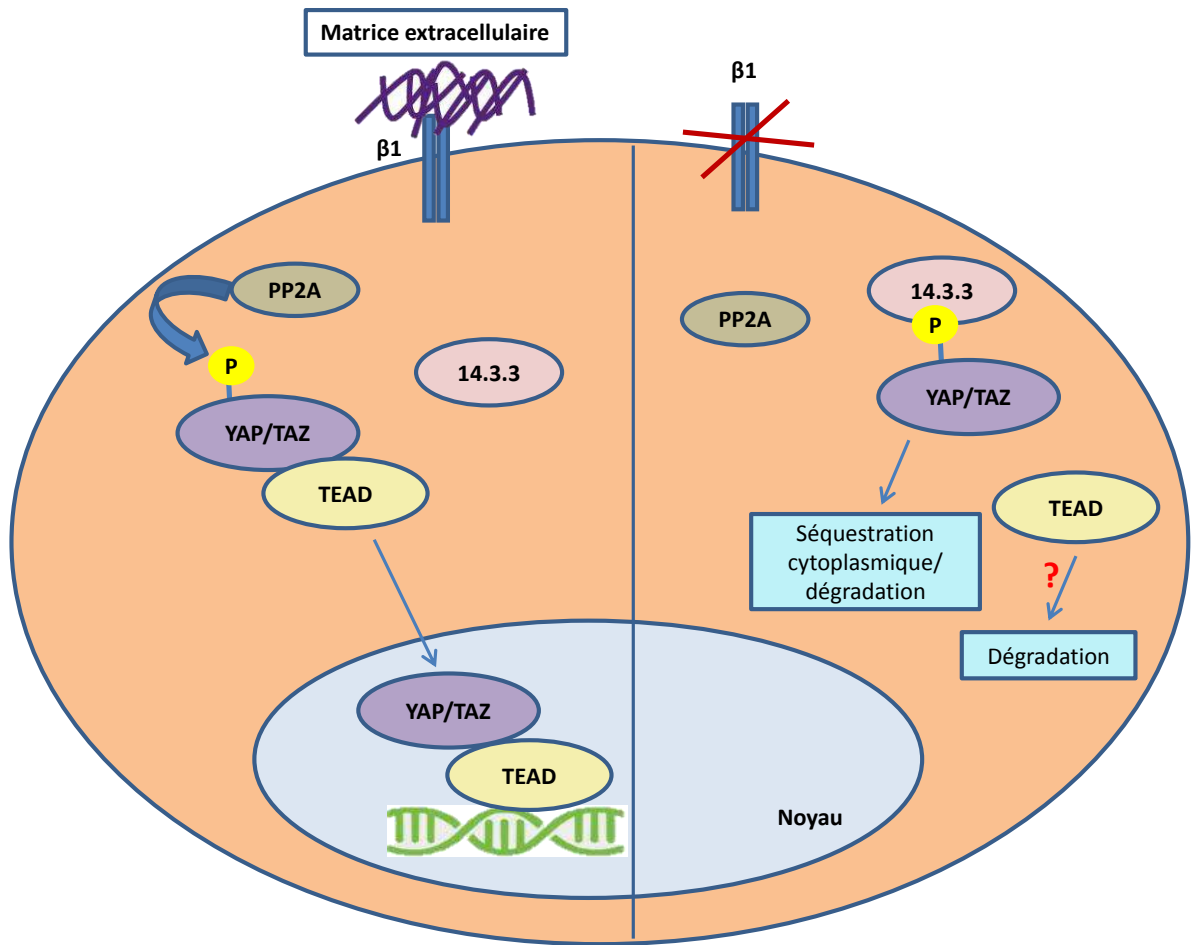


Figure 4.2 : Régulation de la localisation cellulaire de YAP en fonction du taux d'acétylation de 14.3.3. Un processus intégrine $\beta 1$ dépendant.

Chapitre 5: Matériels et Méthodes

5.1 Matériels

5.1.1 Anticorps, molécules et amorces

5.1.1.1 Les anticorps

Les anticorps utilisés sont indiqués dans le tableau ci-après.

Anticorps	Commercialisé par	Dilution western blot	Dilution Immunofluorescence
YAP/TAZ	Cell signaling	-	1/600
YAP	Santa Cruz biotechnology	1/100	1/400
p-YAP	Cell signaling	1/1000	1/600
LATS	Cell signaling	1/1000	1/200
p-LATS	Cell signaling	1/1000	-
PAK	Santa Cruz biotechnology	1/1000	1/200
p-PAK	Cell signaling	1/250	-
RhoA	Santa Cruz biotechnology	1/1000	-
NF2	Sigma Aldrich	1/1000	1/300
Cdc42	Santa Cruz biotechnology	-	-
Rac1	BD Biosciences	1/500	1/500
p18	Don de Dr S. Manié	1/500	1/200
Actine	Sigma Aldrich	1/5000	-
Lamine B	Santa Cruz biotechnology	1/1000	-
Tubuline	Cell signaling	1/1000	1/600
Cavéoline	Cell signaling	1/1000	-
Ral A	BD Biosciences	1/1000	-
CD63	BD Biosciences	1/1000	-

Tubuline acétylé	Sigma Aldrich	1/1000	-
Lamp1	Abcam	1/1000	-
Sodium pump alpha 1	Abcam	1/1000	-

5.1.1.2 Les molécules

Les molécules utilisées sont indiquées dans le tableau ci-après.

Molécules	Fournisseur	Concentration finale utilisée
Forskoline (FSK)	Sigma Aldrich	10µM
Inhibiteur PAK (IPA3)	Sigma Aldrich	10µM pour IF 20µM pour IP
5-ethynyl-2'-deoxyuridine (edu)	Abcam	10µM
Inhibiteur Rac (EHT1864)	Tocris	5µM
Trichostatine (TSA)	Sigma Aldrich	10µg/ml
Primaquine (PQ)	Sigma Aldrich	50µM
Dynasore	Sigma Aldrich	0,9mM
Nocodazole	Sigma Aldrich	10µM
Inhibiteur géranylgeranyltransférase I (GGTI)	Sigma Aldrich	10µM

5.1.1.3 Les amorces

Les amorces utilisées sont groupées dans le tableau ci-après.

	Séquence « sens »	Séquence « anti-sens »
Cyr61	TAA-GGT-CTG-CGC-TAA-ACA-ACT-C	CAG-ATC-CCT-TTC-AGA-GCG-GT
CTGF	TGC-TGT-GCA-GGT-GAT-AAA-GC	AAG-GCA-TTT-GTT-CAC-CAA-C
ANKRD1	TTG-TGA-AGG-AGC-CAG-AAC-CT	CGC-CAA-GTG-TCC-TTC-TAA-GC
CCND1	AGA-AGT-GCG-AAG-AGG-AGG-TC	TTC-TCG-GCA-GTC-AAG-GGA-AT
CCND2	GCC-AAG-ATC-ACC-CAC-ACT-GA	GCG-TTA-TGC-TGC-TCT-TGA-CG
P19^{ARF}	AAC-TCT-TTC-GGT-CGT-ACC-CC	GAT-GTC-TTG-ATG-TCC-CCG-CT
CDKN1A	GGC-CCG-GAA-CAT-CTC-AGG	AAA-TCT-GTC-AGG-CTG-GTC-TGC

5.1.2 Les bactéries

Des bactéries *Escherichia coli* NEB5 α (New England Biolabs) ultra-compétentes sont transformées par choc thermique (30 sec à 42°C) pour amplifier les ADN plasmidiques.

5.1.3 Les ADN plasmidiques

Les vecteurs d'expressions sont : pCMV-flag YAP2^{5SA} (don de Dr. K.L. Guan), pQCXIP-flag YAP2^{5SA}, pBabepuro-MEK1^{Q56P} et pBabepuroERK2MEK1-LA (dons de Dr. M. Barbacid), pEGFP-Rac1^{G12V}, pEGFP-Rac1^{Q61L}, pEGFP-Cdc42^{G12V}, pEGFP-RhoA^{G14V} et pBABEpuroGFP-Rac1^{G12V} (dons de Dr C. Gauthier-Rouvière), pYFP-RhoA (don de Dr. A. Mettouchi), pCMV6M-PAK1^{T423E} (don de Dr Chernoff), pEGFP-p18 (don de Dr Okada), pBabe NF2^{wt} et pBabe-NF2^{BB} (dons de Dr. T. Jacks).

5.2 Les méthodes

5.2.1 Méthodes de biologie cellulaire

5.2.1.1 Génération des lignées cellulaires

Les cellules Rac1^{G12V}, Rac1^{Q61L}, Cdc42^{G12V}, RhoA^{G14V}, NF2^{wt}, NF2^{BB}, YAP^{55A} ont été générées à partir des lignées délétées ou non pour l'intégrine $\beta 1$ et infectées avec les vecteurs rétroviraux correspondants.

5.2.1.2 Transfection et infection rétrovirale

Afin de produire les virions, $3 \cdot 10^6$ cellules GP2-293 sont ensemencées, 12-24h avant la transfection. 1h avant la transfection, le milieu est remplacé avec du milieu contenant 25 μ M de la chloroquine afin d'améliorer la transfection. Une solution d'Exgen/NaCl 150mM est ajoutée à 10 μ g d'ADN (5 μ g ADN vecteur d'expression + 5 μ g ADN vecteur protéine d'enveloppe). Le mélange est incubé 15 min à température ambiante. Le mélange Exgen/ADN est ajouté goutte à goutte sur les cellules. Après 48h, le surnageant contenant les virus est récupéré.

Afin de réaliser les infections, $4 \cdot 10^4$ cellules $\beta 1^{f/f}$ et $\beta 1^{-/-}$ sont ensemencées dans une boîte de 6 puits, 12h avant l'infection. L'infection est réalisée en diluant les solutions rétrovirales au demi en présence du polybrène (8 μ g/ml). Les cellules sont incubées à 37°C pendant 48h.

5.2.1.3 Immunofluorescence

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verres pendant 12-18h. Les cellules sont ensuite lavées avec du tampon PBS (1X) et fixées avec une solution 4% paraformaldéhyde (PFA) et 3% sucrose pendant 10 min. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec une solution 0,2% de Triton X-100 puis saturées dans du sérum de chèvre, pendant 30 min. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire à température ambiante, pendant 1h30min. Après trois lavages avec une solution de PBS 0.1%Tween 20, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome (Alexa 488 et Alexa 555) à température ambiante, dans l'obscurité et pendant 1h30min. Les cellules sont de nouveau lavées trois fois avec une solution de PBS 0.1%Tween 20. Puis incubées avec du D.A.P.I (Life technology) pendant 10 min. Enfin, les lamelles sont montées avec du

mowiol (Sigma Aldrich) et observées au microscope Axioimager ou au microscope LSM 510 laser scanning confocal.

5.2.1.4 Test de prolifération

Les cellules sont synchronisées en les mettant en suspension pendant 3-4h puis ensemencées sur des lamelles de verres pendant 12-18h. L'EdU est ajouté pendant 30 min. Après lavages en PBS les cellules sont fixées avec une solution de PFA 4% et sucrose 3% pendant 10 min puis lavées avec une solution de TBS. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution de Tris 110mM (pH 8.5), CuSO_4 1mM, d'acide ascorbique 0.6M et de l'alexa azido pendant 30 min dans l'obscurité et à température ambiante. Après lavage des cellules avec du TBS-0.2 % Triton X-100, les cellules sont incubées avec du D.A.P.I pendant 10 min. Enfin, les lamelles sont montées avec du mowiol et observées au microscope Olympus BX51.

5.2.1.5 Test d'étalement cellulaire

Les lamelles de verres sont traitées à la fibronectine de bovine (purifiée au laboratoire) pendant une nuit à 4°C à une concentration finale de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puis lavées trois fois avec du PBS. Puis les cellules sont ensemencées sur les lamelles. Après 15 min, 30 min, 60 min, 120 min et 180 min d'étalement cellulaire, les cellules sont fixées avec de la PFA. Ensuite un marquage d'immunofluorescence est réalisé comme décrit dans la partie **5.2.1.3**.

5.2.2 Méthodes de biochimie

5.2.2.1 Electrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide et Western Blot

Les cellules sont lysées avec du tampon RIPA (Triton-X100 1%, sodium deoxycholate 1%, SDS 0,1%, NaCl 150mM, Tris 50mM pH7.2). Les protéines ont été séparées par migration sur un gel SDS-PAGE 10% et transférées sur une membrane de PVDF (Amersham 45 μm). La membrane est saturée à l'aide d'une solution TBS-Tween-20 0.1%-BSA 3% pendant 1h, puis incubée avec l'anticorps primaire approprié à 4°C pendant une nuit. Après trois lavages avec du TBS-Tween-20 0.1%, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire approprié couplé à la HRP (HorseRadish Peroxidase) pendant 1h à température ambiante. La membrane est de nouveau lavée trois fois avec une du TBS-Tween-20 0.1%. La révélation se fait par chimioluminescence à l'aide d'un kit ECL (Pierce).

5.2.2.2 Fractionnement cellulaire

5.2.2.2.1 Séparation cytoplasme/membrane

Les cellules sont lavées avec du PBS (1X) et récupérées dans des tubes eppendorfs. Elles sont culotées par centrifugation pendant 5min à 2500rpm. Les cellules sont ensuite incubées dans la glace avec du tampon hypotonique (10mM hepes pH 7.4, 1mM EDTA) pendant 10 min. Ensuite, les cellules sont lysées au douce (25 coups) et centrifugées pendant 5 min à 2500 rpm afin d'éliminer les noyaux. Le surnageant est centrifugé pendant 15 min à 6000 rpm afin d'éliminer les mitochondries.

Afin de récupérer la fraction membranaire totale : Le surnageant est ultracentrifugé pendant 20 min à 120000 rpm. Le surnageant est la fraction cytoplasmique et le culot est la fraction membranaire. Le culot est lavé avec du tampon hypotonique et resuspendu avec du tampon de solubilisation des membranes (50mM tris pH 7.4, 1% triton ×100, 150mM NaCl et 1mM EDTA).

Afin de séparer les fractions endo-lysosomale et endosome/membrane plasmique : Le surnageant est centrifugé pendant 1h à 15000g. La fraction endo-lysosomale est contenue dans le culot. Le surnageant est ultracentrifugé pendant 20 min à 120000 rpm. Le surnageant est la fraction cytoplasmique et le culot contient la fraction endosome/membrane plasmique.

5.2.2.2.2 Séparation noyau et cytoplasme/membrane

Les cellules sont lavées avec du PBS (1X) et récupérées dans des tubes eppendorfs. Les cellules sont culotées par centrifugation pendant 5min à 2500rpm. Les cellules sont lysées avec le tampon de lyse (0,34M saccharose, 650µM spermidine, 2mM EDTA, 0,5mM EGTA, 0.1 % triton, 1mM DTT, 600mM KCl, 150mM NaCl, 150 mM pH 7.4 Tris HCl). Les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 2500 rpm. Le surnageant est la fraction cytoplasme/membrane. Le culot est repris avec le tampon de lyse, déposé sur un coussin de sucrose et centrifugé pendant 5 min à 2500 rpm afin de le purifier. Le culot est la fraction nucléaire.

5.2.2.3 Immunoprécipitation

En utilisant l'épitope Flag: Les cellules sont traitées (ou non traitées) pendant une nuit avec la molécule d'IPA3 utilisé à une concentration finale de 20µM. Après l'incubation, les

fractions cytoplasmique et membranaire sont séparées. La fraction membranaire est re-solubilisée en tampon Tris HCl 10mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 0.5mM, NP40 0.25%. Chacune des fractions est incubée avec des billes magnétiques Anti-Flag M2 (Sigma Aldrich M8823) pendant une nuit à 4°C sous rotation. Après plusieurs lavages en PBS les protéines sont éluées avec du tampon Laemmli sans agent réducteur.

En utilisant la GFP : Les cellules sont lysées dans un tampon contenant du Tris 10mM pH 7.5, NaCl 150mM, EDTA 0.5mM, NP-40 0.5% pendant 30 min dans la glace, puis centrifugées à 13200 rpm pendant 30 min. Le lysat cellulaire est ensuite incubé avec des billes magnétiques GFP-Trap (Chromotek) pendant une nuit à 4°C sur une roue. Après lavages en PBS, les protéines sont éluées avec du tampon Laemmli.

5.2.2.4 Production de protéines recombinantes en système bactérien et GST-Pull Down

La production des protéines de fusion GST-PAKcrib et GST-Rhotekin est réalisée dans les bactéries BL21RIL. Après transformation des bactéries et étalement sur une boîte de pétri, une préculture de 3ml estensemencée avec une colonie et incubée une nuit à 37°C sous agitation. Une culture de 600ml estensemencée avec 600ul de la préculture et incubée pendant 5h à 6h à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,6. La production de protéines recombinantes est induite par l'ajout d'IPTG à 1mM. Après une incubation d'une nuit à température ambiante sous agitation, la culture bactérienne est centrifugée à 5000rpm pendant 20min à 4°C. Le culot est resuspendu en tampon Tris 50mM pH7.7, NaCl 500mM, EDTA 1mM, Triton 0.5%, DTT 1mM contenant des inhibiteurs de protéases et lysé par sonication. Le lysat bactérien est ensuite obtenu après centrifugation à 15000rpm pendant 20min à 4°C.

En parallèle les cellules sont lysées dans un tampon contenant Tris-HCl 50mM pH 7.5, Triton X-100 1%, NaCl 100mM, MgCl₂ 10mM, glycerol 5%, Na₃VO₄ 1mM. Les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 13200 rpm à 4°C. Le lysat cellulaire était incubé pendant 1h avec du lysat bactérien contenant la protéine GST-PAKcrib ou la protéine GST-Rhotekin puis de nouveau 1h avec des billes glutathione-Sepharose. Après l'incubation, les billes sont collectées par centrifugation, et lavées trois fois avec un tampon 25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 1mM dithiothréitol (DTT), 100mM NaCl et 30mM MgCl₂. L'éluion des protéines est réalisée avec du tampon Laemmli.

5.2.3 Méthodes de biologie moléculaire

5.2.3.1 Extraction d'ARN

Après avoir retiré le milieu de culture, 1ml de Trizol (Ambion) est ajouté sur les cellules afin de les lyser. Après incubation 5 min à température ambiante, le lysat cellulaire est récupéré dans un tube eppendorf de 2ml. 200 µl de chloroforme sont ajoutés au lysat cellulaire et incubé pendant 2 min à température ambiante. Une centrifugation à 12000 rpm pendant 15 min à 4°C est réalisée. Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée et 500µl d'isopropanol sont ajoutés. Après 10 min d'incubation, une centrifugation à 12000 rpm pendant 10 min à 4°C est réalisée. Le culot obtenu contient les ARNs. Le culot d'ARNs est lavé avec 1ml d'éthanol 75% puis centrifugé à 10000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot d'ARN est laissé à l'air libre afin de sécher pendant une dizaine de minutes. Ensuite le culot d'ARNs est purifié/nettoyé en suivant le protocole de Qiagen RNA clean up. La quantité d'ARN est mesurée avec le Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

5.2.3.2 Réaction de RT-qPCR

La réaction de reverse transcription (RT) est réalisée à l'aide du kit Biorad 5X iScript Reverse Transcription Supermix en mélangeant 1µg d'ARN avec 4µl iScript RT (5X), H₂O q.s.p 20µl. Le programme de RT PCR lancé est : 10 min à 25°C, 30 min à 42°C et 5 min à 85°C. La préparation de la RT PCR est diluée au 1/10 afin de l'utiliser pour la réaction de QPCR. Dans chaque puits de la plaque, 2µl de la RT PCR diluée et 18µl d'un mix iTaq SyberGreen supermix 2X/amorces (concentration finale 10µM) sont ajoutés. Chaque échantillon est réalisé en triplicat. La réaction est lancée en utilisant l'appareil Biorad CFX96.

Références bibliographiques

- [1] T. A. Franz-Odenaal, B. K. Hall, and P. E. Witten, "Buried alive: How osteoblasts become osteocytes," *Dev. Dyn.*, vol. 235, no. 1, pp. 176–190, Jan. 2006.
- [2] P. Marie, "Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste," *médecine/sciences*, vol. 17, no. 12, pp. 1252–1259, Dec. 2001.
- [3] D. E. Discher, P. Janmey, and Y.-L. Wang, "Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate," *Science*, vol. 310, no. 5751, pp. 1139–1143, Nov. 2005.
- [4] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–689, Aug. 2006.
- [5] A. S. Rowlands, P. A. George, and J. J. Cooper-White, "Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs: interplay of stiffness and adhesive ligand presentation," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 295, no. 4, pp. C1037–1044, Oct. 2008.
- [6] M. D. Deel, J. J. Li, L. E. S. Crose, and C. M. Linardic, "A Review: Molecular Aberrations within Hippo Signaling in Bone and Soft-Tissue Sarcomas," *Front. Oncol.*, vol. 5, p. 190, 2015.
- [7] M. Capulli, R. Paone, and N. Rucci, "Osteoblast and osteocyte: games without frontiers," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 561, pp. 3–12, Nov. 2014.
- [8] T. Komori *et al.*, "Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts," *Cell*, vol. 89, no. 5, pp. 755–764, May 1997.
- [9] W. S. Argraves, S. Suzuki, H. Arai, K. Thompson, M. D. Pierschbacher, and E. Ruoslahti, "Amino acid sequence of the human fibronectin receptor.," *J. Cell Biol.*, vol. 105, no. 3, pp. 1183–1190, 1987.
- [10] B.-H. Luo, C. V. Carman, and T. A. Springer, "Structural basis of integrin regulation and signaling," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 25, pp. 619–647, 2007.
- [11] A. P. Mould, J. A. Askari, and M. J. Humphries, "Molecular Basis of Ligand Recognition by Integrin 5 1: I. SPECIFICITY OF LIGAND BINDING IS DETERMINED BY AMINO ACID SEQUENCES IN THE SECOND AND THIRD NH₂-TERMINAL REPEATS OF THE SUBUNIT," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 27, pp. 20324–20336, Jul. 2000.
- [12] E. Ruoslahti and M. D. Pierschbacher, "New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins," *Science*, vol. 238, no. 4826, pp. 491–497, Oct. 1987.
- [13] A. van der Flier and A. Sonnenberg, "Function and interactions of integrins," *Cell Tissue Res.*, vol. 305, no. 3, pp. 285–298, Sep. 2001.
- [14] J. O. Lee, P. Rieu, M. A. Arnaout, and R. Liddington, "Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18)," *Cell*, vol. 80, no. 4, pp. 631–638, Feb. 1995.
- [15] R. Pardi, G. Bossi, L. Inverardi, E. Rovida, and J. R. Bender, "Conserved regions in the cytoplasmic domains of the leukocyte integrin alpha L beta 2 are involved in endoplasmic reticulum retention, dimerization, and cytoskeletal association.," *J. Immunol.*, vol. 155, no. 3, pp. 1252–1263, 1995.
- [16] S. Liu, D. A. Calderwood, and M. H. Ginsberg, "Integrin cytoplasmic domain-binding proteins," *J. Cell Sci.*, vol. 113, no. 20, pp. 3563–3571, 2000.
- [17] S. J. Shattil, C. Kim, and M. H. Ginsberg, "The final steps of integrin activation: the end game," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 4, pp. 288–300, Apr. 2010.
- [18] D. Bouvard, J. Pouwels, N. De Franceschi, and J. Ivaska, "Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, no. 7, pp. 430–442, Jul. 2013.

- [19] A. Hall, "Rho GTPases and the actin cytoskeleton," *Science*, vol. 279, no. 5350, pp. 509–514, Jan. 1998.
- [20] B. L. Riggs and A. M. Parfitt, "Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 20, no. 2, pp. 177–184, Feb. 2005.
- [21] P. J. Marie and M. Kassem, "Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 165, no. 1, pp. 1–10, Jul. 2011.
- [22] V. Rosen, "BMP2 signaling in bone development and repair," *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 20, no. 5–6, pp. 475–480, Dec. 2009.
- [23] P. V. N. Bodine and B. S. Komm, "Wnt signaling and osteoblastogenesis," *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, vol. 7, no. 1–2, pp. 33–39, Jun. 2006.
- [24] P. J. Marie, "Targeting integrins to promote bone formation and repair," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 9, no. 5, pp. 288–295, May 2013.
- [25] J. A. Phillips *et al.*, "Role for beta1 integrins in cortical osteocytes during acute musculoskeletal disuse," *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.*, vol. 27, no. 7, pp. 609–618, Sep. 2008.
- [26] A. M. Moursi *et al.*, "Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation," *J. Cell Sci.*, vol. 109 (Pt 6), pp. 1369–1380, Jun. 1996.
- [27] R. K. Globus, S. B. Doty, J. C. Lull, E. Holmuhamedov, M. J. Humphries, and C. H. Damsky, "Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts," *J. Cell Sci.*, vol. 111 (Pt 10), pp. 1385–1393, May 1998.
- [28] D. Ilić, E. A. Almeida, D. D. Schlaepfer, P. Dazin, S. Aizawa, and C. H. Damsky, "Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis," *J. Cell Biol.*, vol. 143, no. 2, pp. 547–560, Oct. 1998.
- [29] D. Zimmerman, F. Jin, P. Leboy, S. Hardy, and C. Damsky, "Impaired bone formation in transgenic mice resulting from altered integrin function in osteoblasts," *Dev. Biol.*, vol. 220, no. 1, pp. 2–15, Apr. 2000.
- [30] D. Bouvard, A. Aszodi, G. Kostka, M. R. Block, C. Albigès-Rizo, and R. Fässler, "Defective osteoblast function in ICAP-1-deficient mice," *Dev. Camb. Engl.*, vol. 134, no. 14, pp. 2615–2625, Jul. 2007.
- [31] J. El-Hoss, A. Arabian, S. Dedhar, and R. St-Arnaud, "Inactivation of the integrin-linked kinase (ILK) in osteoblasts increases mineralization," *Gene*, vol. 533, no. 1, pp. 246–252, Jan. 2014.
- [32] M. Larsen, V. V. Artym, J. A. Green, and K. M. Yamada, "The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 463–471, Oct. 2006.
- [33] K. R. Legate, S. A. Wickström, and R. Fässler, "Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling," *Genes Dev.*, vol. 23, no. 4, pp. 397–418, Feb. 2009.
- [34] V. Baldin, J. Lukas, M. J. Marcote, M. Pagano, and G. Draetta, "Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1," *Genes Dev.*, vol. 7, no. 5, pp. 812–821, 1993.
- [35] C. H. Streuli, "Integrins and cell-fate determination," *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. 2, pp. 171–177, Jan. 2009.
- [36] P. Moreno-Layseca and C. H. Streuli, "Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression," *Matrix Biol.*, vol. 34, pp. 144–153, Feb. 2014.

- [37] A. R. Grassian, Z. T. Schafer, and J. S. Brugge, "ErbB2 Stabilizes Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression via Erk and Sprouty2 in Extracellular Matrix-detached Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 1, pp. 79–90, Jan. 2011.
- [38] S.-H. Kim, J. Turnbull, and S. Guimond, "Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor," *J. Endocrinol.*, vol. 209, no. 2, pp. 139–151, May 2011.
- [39] A. P. Gilmore, "Anoikis," *Cell Death Differ.*, vol. 12, pp. 1473–1477, Nov. 2005.
- [40] M. Z. Gilcrease, "Integrin signaling in epithelial cells," *Cancer Lett.*, vol. 247, no. 1, pp. 1–25, Mar. 2007.
- [41] S. Pullan *et al.*, "Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium," *J. Cell Sci.*, vol. 109, no. 3, pp. 631–642, 1996.
- [42] D. Naci and F. Aoudjit, "Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 9, pp. 2008–2015, Sep. 2014.
- [43] S. Cory and J. M. Adams, "The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 9, pp. 647–656, Sep. 2002.
- [44] A. P. Gilmore, A. D. Metcalfe, L. H. Romer, and C. H. Streuli, "Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization," *J. Cell Biol.*, vol. 149, no. 2, pp. 431–446, Apr. 2000.
- [45] M. J. Reginato *et al.*, "Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis," *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 8, pp. 733–740, Aug. 2003.
- [46] T. Xu, W. Wang, S. Zhang, R. A. Stewart, and W. Yu, "Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase," *Development*, vol. 121, no. 4, pp. 1053–1063, 1995.
- [47] R. W. Justice, O. Zilian, D. F. Woods, M. Noll, and P. J. Bryant, "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.*, vol. 9, no. 5, pp. 534–546, 1995.
- [48] N. Tapon *et al.*, "salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines," *Cell*, vol. 110, no. 4, pp. 467–478, 2002.
- [49] S. Pantalacci, N. Tapon, and P. Léopold, "The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*," *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 10, pp. 921–927, Oct. 2003.
- [50] Z.-C. Lai *et al.*, "Control of Cell Proliferation and Apoptosis by Mob as Tumor Suppressor, Mats," *Cell*, vol. 120, no. 5, pp. 675–685, Mar. 2005.
- [51] S. Wu, J. Huang, J. Dong, and D. Pan, "hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts," *Cell*, vol. 114, no. 4, pp. 445–456, 2003.
- [52] J. Huang, S. Wu, J. Barrera, K. Matthews, and D. Pan, "The Hippo Signaling Pathway Coordinately Regulates Cell Proliferation and Apoptosis by Inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP," *Cell*, vol. 122, no. 3, pp. 421–434, Aug. 2005.
- [53] S. Wu, Y. Liu, Y. Zheng, J. Dong, and D. Pan, "The TEAD/TEF Family Protein Scalloped Mediates Transcriptional Output of the Hippo Growth-Regulatory Pathway," *Dev. Cell*, vol. 14, no. 3, pp. 388–398, Mar. 2008.
- [54] B. A. Edgar, "From Cell Structure to Transcription: Hippo Forges a New Path," *Cell*, vol. 124, no. 2, pp. 267–273, Jan. 2006.

- [55] E. H. Y. Chan, M. Nousiainen, R. B. Chalamalasetty, A. Schäfer, E. A. Nigg, and H. H. W. Silljé, "The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1," *Oncogene*, vol. 24, no. 12, pp. 2076–2086, Mar. 2005.
- [56] J.-H. Lee *et al.*, "A crucial role of WW45 in developing epithelial tissues in the mouse," *EMBO J.*, vol. 27, no. 8, pp. 1231–1242, 2008.
- [57] M. Praskova, F. Xia, and J. Avruch, "MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation," *Curr. Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 311–321, Mar. 2008.
- [58] A. Chow, Y. Hao, and X. Yang, "Molecular characterization of human homologs of yeast MOB1," *Int. J. Cancer*, p. NA–NA, 2009.
- [59] J. Zhang, G. A. Smolen, and D. A. Haber, "Negative Regulation of YAP by LATS1 Underscores Evolutionary Conservation of the Drosophila Hippo Pathway," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 8, pp. 2789–2794, Apr. 2008.
- [60] B. Zhao, L. Li, K. Tumaneng, C.-Y. Wang, and K.-L. Guan, "A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF -TRCP," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 1, pp. 72–85, Jan. 2010.
- [61] B. Zhao *et al.*, "Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 21, pp. 2747–2761, Nov. 2007.
- [62] Y. Hao, A. Chun, K. Cheung, B. Rashidi, and X. Yang, "Tumor Suppressor LATS1 Is a Negative Regulator of Oncogene YAP," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 9, pp. 5496–5509, Dec. 2007.
- [63] T. Oka, V. Mazack, and M. Sudol, "Mst2 and Lats Kinases Regulate Apoptotic Function of Yes Kinase-associated Protein (YAP)," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 41, pp. 27534–27546, Oct. 2008.
- [64] L. Lu *et al.*, "Hippo signaling is a potent in vivo growth and tumor suppressor pathway in the mammalian liver," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 107, no. 4, pp. 1437–1442, 2010.
- [65] C.-Y. Liu *et al.*, "The Hippo Tumor Pathway Promotes TAZ Degradation by Phosphorylating a Phosphodegron and Recruiting the SCF -TrCP E3 Ligase," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 48, pp. 37159–37169, Nov. 2010.
- [66] S. Piccolo, S. Dupont, and M. Cordenonsi, "The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond," *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 4, pp. 1287–1312, Oct. 2014.
- [67] A.-M. Håkelién *et al.*, "The regulatory landscape of osteogenic differentiation," *Stem Cells Dayt. Ohio*, vol. 32, no. 10, pp. 2780–2793, Oct. 2014.
- [68] J.-H. Hong *et al.*, "TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation," *Science*, vol. 309, no. 5737, pp. 1074–1078, Aug. 2005.
- [69] J.-Y. Yang *et al.*, "Osteoblast-targeted overexpression of TAZ increases bone mass in vivo," *PLoS One*, vol. 8, no. 2, p. e56585, 2013.
- [70] S. Dupont *et al.*, "Role of YAP/TAZ in mechanotransduction," *Nature*, vol. 474, no. 7350, pp. 179–183, juin 2011.
- [71] S. K. Zaidi *et al.*, "Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription," *EMBO J.*, vol. 23, no. 4, pp. 790–799, Feb. 2004.
- [72] E. Seo *et al.*, "SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage," *Cell Rep.*, vol. 3, no. 6, pp. 2075–2087, Jun. 2013.
- [73] J. Lee *et al.*, "Mst2 Controls Bone Homeostasis by Regulating Osteoclast and Osteoblast Differentiation," *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.*, vol. 30, no. 9, pp. 1597–1607, Sep. 2015.

- [74] Y. Tang, T. Feinberg, E. T. Keller, X.-Y. Li, and S. J. Weiss, "Snail/Slug binding interactions with YAP/TAZ control skeletal stem cell self-renewal and differentiation," *Nat. Cell Biol.*, vol. 18, no. 9, pp. 917–929, Sep. 2016.
- [75] G. Halder, S. Dupont, and S. Piccolo, "Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 9, pp. 591–600, 2012.
- [76] L. Sansores-Garcia *et al.*, "Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway," *EMBO J.*, vol. 30, no. 12, pp. 2325–2335, 2011.
- [77] N.-G. Kim and B. M. Gumbiner, "Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway," *J. Cell Biol.*, vol. 210, no. 3, pp. 503–515, Aug. 2015.
- [78] Y. Tang *et al.*, "MT1-MMP-dependent control of skeletal stem cell commitment via a β 1-integrin/YAP/TAZ signaling axis," *Dev. Cell*, vol. 25, no. 4, pp. 402–416, May 2013.
- [79] K. Kaneko, M. Ito, Y. Naoe, A. Lacy-Hulbert, and K. Ikeda, "Integrin α v in the mechanical response of osteoblast lineage cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 447, no. 2, pp. 352–357, May 2014.
- [80] I. Serrano, P. C. McDonald, F. Lock, W. J. Muller, and S. Dedhar, "Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2976, 2013.
- [81] H. Clevers, K. M. Loh, and R. Nusse, "An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control," *Science*, vol. 346, no. 6205, pp. 1248012–1248012, Oct. 2014.
- [82] M. Imajo, K. Miyatake, A. Imura, A. Miyamoto, and E. Nishida, "A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/ β -catenin signalling," *EMBO J.*, vol. 31, no. 5, pp. 1109–1122, Mar. 2012.
- [83] X. Varelas *et al.*, "The Hippo Pathway Regulates Wnt/ β -Catenin Signaling," *Dev. Cell*, vol. 18, no. 4, pp. 579–591, Apr. 2010.
- [84] F. Cong, L. Schweizer, and H. Varmus, "Casein Kinase I ϵ Modulates the Signaling Specificities of Dishevelled," *Mol. Cell Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 2000–2011, Mar. 2004.
- [85] J. Hao *et al.*, "Role of extracellular matrix and YAP/TAZ in cell fate determination," *Cell. Signal.*, vol. 26, no. 2, pp. 186–191, Feb. 2014.
- [86] L. Azzolin *et al.*, "Role of TAZ as mediator of Wnt signaling," *Cell*, vol. 151, no. 7, pp. 1443–1456, Dec. 2012.
- [87] M. R. Byun *et al.*, "Canonical Wnt signalling activates TAZ through PP1A during osteogenic differentiation," *Cell Death Differ.*, vol. 21, no. 6, pp. 854–863, Jun. 2014.
- [88] D. Javelaud and A. Mauviel, "Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physio-pathological roles," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 36, no. 7, pp. 1161–1165, Jul. 2004.
- [89] X. Varelas *et al.*, "TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal," *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 7, pp. 837–848, Jul. 2008.
- [90] L. Zhao, S. Jiang, and B. M. Hantash, "Transforming growth factor beta1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells," *Tissue Eng. Part A*, vol. 16, no. 2, pp. 725–733, Feb. 2010.
- [91] K. Tumaneng, R. C. Russell, and K.-L. Guan, "Organ Size Control by Hippo and TOR Pathways," *Curr. Biol.*, vol. 22, no. 9, pp. R368–R379, May 2012.
- [92] X. M. Ma and J. Blenis, "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 10, no. 5, pp. 307–318, May 2009.
- [93] M. Laplante and D. M. Sabatini, "mTOR Signaling in Growth Control and Disease," *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274–293, Apr. 2012.

- [94] K. Tumaneng *et al.*, "YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI3K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29," *Nat. Cell Biol.*, vol. 14, no. 12, pp. 1322–1329, Dec. 2012.
- [95] W. Zhang and H. T. Liu, "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells," *Cell Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 9–18, Mar. 2002.
- [96] B. V. V. G. Reddy and K. D. Irvine, "Regulation of Hippo Signaling by EGFR-MAPK Signaling through Ajuba Family Proteins," *Dev. Cell*, vol. 24, no. 5, pp. 459–471, Mar. 2013.
- [97] B. You *et al.*, "Inhibition of ERK1/2 down-regulates the Hippo/YAP signaling pathway in human NSCLC cells," *Oncotarget*, vol. 6, no. 6, p. 4357, 2015.
- [98] H. Song *et al.*, "Ablation of Rassf2 induces bone defects and subsequent haematopoietic anomalies in mice," *EMBO J.*, vol. 31, no. 5, pp. 1147–1159, Mar. 2012.
- [99] F.-X. Yu *et al.*, "Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein coupled receptor signaling," *Cell*, vol. 150, no. 4, pp. 780–791, Aug. 2012.
- [100] E. Miller *et al.*, "Identification of Serum-Derived Sphingosine-1-Phosphate as a Small Molecule Regulator of YAP," *Chem. Biol.*, vol. 19, no. 8, pp. 955–962, Aug. 2012.
- [101] J.-S. Mo, F.-X. Yu, R. Gong, J. H. Brown, and K.-L. Guan, "Regulation of the Hippo-YAP pathway by protease-activated receptors (PARs)," *Genes Dev.*, vol. 26, no. 19, pp. 2138–2143, Oct. 2012.
- [102] C. T. Walsh *et al.*, "Thrombin receptor and RhoA mediate cell proliferation through integrins and cysteine-rich protein 61," *FASEB J.*, vol. 22, no. 11, pp. 4011–4021, Nov. 2008.
- [103] R. C. Chambers, P. Leoni, O. P. Blanc-Brude, D. E. Wembridge, and G. J. Laurent, "Thrombin Is a Potent Inducer of Connective Tissue Growth Factor Production via Proteolytic Activation of Protease-activated Receptor-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 45, pp. 35584–35591, Nov. 2000.
- [104] F. Oury *et al.*, "Endocrine Regulation of Male Fertility by the Skeleton," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 796–809, Mar. 2011.
- [105] C. D. Van Raamsdonk *et al.*, "Mutations in *GNA11* in Uveal Melanoma," *N. Engl. J. Med.*, vol. 363, no. 23, pp. 2191–2199, Dec. 2010.
- [106] C. Torre, S. J. Wang, W. Xia, and L. Y. W. Bourguignon, "Reduction of Hyaluronan-CD44-Mediated Growth, Migration, and Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer Due to Inhibition of Rho Kinase and PI-3 Kinase Signaling," *Arch. Otolaryngol. Neck Surg.*, vol. 136, no. 5, p. 493, May 2010.
- [107] M. Tsuneki and J. A. Madri, "CD44 Regulation of Endothelial Cell Proliferation and Apoptosis via Modulation of CD31 and VE-cadherin Expression," *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 9, pp. 5357–5370, Feb. 2014.
- [108] S. J. Goldie, K. W. Mulder, D. W.-M. Tan, S. K. Lyons, A. H. Sims, and F. M. Watt, "FRMD4A Upregulation in Human Squamous Cell Carcinoma Promotes Tumor Growth and Metastasis and Is Associated with Poor Prognosis," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 13, pp. 3424–3436, Jul. 2012.
- [109] K. F. Harvey, X. Zhang, and D. M. Thomas, "The Hippo pathway and human cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 13, no. 4, pp. 246–257, Mar. 2013.
- [110] N. Zhang *et al.*, "The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals," *Dev. Cell*, vol. 19, no. 1, pp. 27–38, Jul. 2010.

- [111] F. Yin, J. Yu, Y. Zheng, Q. Chen, N. Zhang, and D. Pan, "Spatial Organization of Hippo Signaling at the Plasma Membrane Mediated by the Tumor Suppressor Merlin/NF2," *Cell*, vol. 154, no. 6, pp. 1342–1355, Sep. 2013.
- [112] W. Li *et al.*, "Merlin/NF2 Loss-Driven Tumorigenesis Linked to CRL4DCAF1-Mediated Inhibition of the Hippo Pathway Kinases Lats1 and 2 in the Nucleus," *Cancer Cell*, vol. 26, no. 1, pp. 48–60, Jul. 2014.
- [113] C. D. Wells *et al.*, "A Rich1/Amot Complex Regulates the Cdc42 GTPase and Apical-Polarity Proteins in Epithelial Cells," *Cell*, vol. 125, no. 3, pp. 535–548, May 2006.
- [114] S. W. Chan, C. J. Lim, Y. F. Chong, A. V. Pobbati, C. Huang, and W. Hong, "Hippo Pathway-independent Restriction of TAZ and YAP by Angiomotin," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 9, pp. 7018–7026, Mar. 2011.
- [115] W. Wang, J. Huang, and J. Chen, "Angiomotin-like Proteins Associate with and Negatively Regulate YAP1," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 6, pp. 4364–4370, Feb. 2011.
- [116] B. Zhao *et al.*, "Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein," *Genes Dev.*, vol. 25, no. 1, pp. 51–63, Jan. 2011.
- [117] Y. Hirate *et al.*, "Polarity-Dependent Distribution of Angiomotin Localizes Hippo Signaling in Preimplantation Embryos," *Curr. Biol.*, vol. 23, no. 13, pp. 1181–1194, Jul. 2013.
- [118] Y. Li *et al.*, "Angiomotin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway," *Cell Res.*, vol. 25, no. 7, pp. 801–817, Jul. 2015.
- [119] Y. Hirate and H. Sasaki, "The role of angiomotin phosphorylation in the Hippo pathway during preimplantation mouse development," *Tissue Barriers*, vol. 2, no. 1, p. e28127, Jan. 2014.
- [120] M. DeRan *et al.*, "Energy Stress Regulates Hippo-YAP Signaling Involving AMPK-Mediated Regulation of Angiomotin-like 1 Protein," *Cell Rep.*, vol. 9, no. 2, pp. 495–503, Oct. 2014.
- [121] W. Wang *et al.*, "AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis," *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 4, pp. 490–499, Mar. 2015.
- [122] I. K. Hariharan, "Energy stress tames the Hippo pathway," *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 4, pp. 362–363, Apr. 2015.
- [123] Z. Li *et al.*, "Structural insights into the YAP and TEAD complex," *Genes Dev.*, vol. 24, no. 3, pp. 235–240, Feb. 2010.
- [124] J.-S. Mo *et al.*, "Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway," *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 4, pp. 500–510, Mar. 2015.
- [125] J. Geng *et al.*, "The kinases Mst1 and Mst2 positively regulate phagocyte ROS induction and bactericidal activity," *Nat. Immunol.*, vol. 16, no. 11, pp. 1142–1152, Nov. 2015.
- [126] T. Matsuda *et al.*, "NF2 Activates Hippo Signaling and Promotes Ischemia/Reperfusion Injury in the Heart," *Circ. Res.*, vol. 119, no. 5, pp. 596–606, Aug. 2016.
- [127] B. Ma *et al.*, "Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase," *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 1, pp. 95–103, Dec. 2014.
- [128] B. Zhao, L. Li, L. Wang, C.-Y. Wang, J. Yu, and K.-L. Guan, "Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis," *Genes Dev.*, vol. 26, no. 1, pp. 54–68, Jan. 2012.

- [129] K.-I. Wada, K. Itoga, T. Okano, S. Yonemura, and H. Sasaki, "Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers," *Development*, vol. 138, no. 18, pp. 3907–3914, Sep. 2011.
- [130] A. Kodama, I. Karakesisoglou, E. Wong, A. Vaezi, and E. Fuchs, "ACF7," *Cell*, vol. 115, no. 3, pp. 343–354, Oct. 2003.
- [131] S. A. Wickström *et al.*, "Integrin-Linked Kinase Controls Microtubule Dynamics Required for Plasma Membrane Targeting of Caveolae," *Dev. Cell*, vol. 19, no. 4, pp. 574–588, Oct. 2010.
- [132] Z. Yang *et al.*, "Knockdown of YAP1 inhibits the proliferation of osteosarcoma cells in vitro and in vivo," *Oncol. Rep.*, vol. 32, no. 3, pp. 1265–1272, Sep. 2014.
- [133] U. Basu-Roy *et al.*, "Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells," *Nat. Commun.*, vol. 6, p. 6411, Apr. 2015.
- [134] D.-Y. Wang *et al.*, "Hippo/YAP signaling pathway is involved in osteosarcoma chemoresistance," *Chin. J. Cancer*, vol. 35, p. 47, May 2016.
- [135] C. Bouvier *et al.*, "Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β 1-integrin in conventional osteosarcoma," *Oncotarget*, vol. 7, no. 40, pp. 64702–64710, Oct. 2016.
- [136] R. O. Hynes, "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines," *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673–687, Sep. 2002.
- [137] X. Zhu and R. K. Assoian, "Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation," *Mol. Biol. Cell*, vol. 6, no. 3, pp. 273–282, Mar. 1995.
- [138] D. Bar-Sagi and A. Hall, "Ras and Rho GTPases: a family reunion," *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 227–238, Oct. 2000.
- [139] M. Radu, G. Semenova, R. Kosoff, and J. Chernoff, "PAK signalling during the development and progression of cancer," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 14, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2014.
- [140] L. S. Price, J. Leng, M. A. Schwartz, and G. M. Bokoch, "Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading," *Mol. Biol. Cell*, vol. 9, no. 7, pp. 1863–1871, 1998.
- [141] S. Matsumoto *et al.*, "A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures," *EMBO J.*, vol. 33, no. 7, pp. 702–718, Apr. 2014.
- [142] N. Balasubramanian, D. W. Scott, J. D. Castle, J. E. Casanova, and M. A. Schwartz, "Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1381–1391, Dec. 2007.
- [143] P. L. Joyce and A. D. Cox, "Rac1 and Rac3 are targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-mediated inhibition of signaling, transformation, and membrane ruffling," *Cancer Res.*, vol. 63, no. 22, pp. 7959–7967, 2003.
- [144] G. Sorrentino *et al.*, "Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway," *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 4, pp. 357–366, Mar. 2014.
- [145] N. Schiefermeier *et al.*, "The late endosomal p14-MP1 (LAMTOR2/3) complex regulates focal adhesion dynamics during cell migration," *J. Cell Biol.*, vol. 205, no. 4, pp. 525–540, May 2014.
- [146] T. A. Cook, T. Nagasaki, and G. G. Gundersen, "Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid," *J. Cell Biol.*, vol. 141, no. 1, pp. 175–185, Apr. 1998.

- [147] A. J. Ridley, "Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking," *Traffic Cph. Den.*, vol. 2, no. 5, pp. 303–310, May 2001.
- [148] Z. Smole *et al.*, "Tumor suppressor NF2/Merlin is a microtubule stabilizer," *Cancer Res.*, vol. 74, no. 1, pp. 353–362, Jan. 2014.
- [149] K. Schlegelmilch *et al.*, "Yap1 Acts Downstream of α -Catenin to Control Epidermal Proliferation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 782–795, Mar. 2011.