

L'interaction entre les voies de signalisation TGF-B et Hippo: implication de la polarité apico-basale et de le protéine ZO-1

Saber Ben Mimoun

► To cite this version:

Saber Ben Mimoun. L'interaction entre les voies de signalisation TGF-B et Hippo: implication de la polarité apico-basale et de le protéine ZO-1. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT: 2018USPCC231. tel-02478724

HAL Id: tel-02478724 https://theses.hal.science/tel-02478724

Submitted on 14 Feb2020

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.



PARIS DIDEROT



Thèse de doctorat de UNIVERSITE SORBONNE PARIS CITE

Préparée à UNIVERSITE PARIS DIDEROT ECOLE DOCTORALE HOB (561) INSTITUT CURIE, Unité INSERM U1021 & CNRS UMR3347 Equipe TGF-ß et Oncogenèse

L'interaction entre les voies de signalisation

TGF-ß et Hippo : implication de la polarité

apico-basale et de la protéine ZO-1

Thèse de doctorat d'oncologie

PAR Saber BEN MIMOUN

Dirigée par Alain MAUVIEL

Soutenue publiquement le 17 Septembre 2018 à l'Institut Curie (Orsay)

Président du Jury : Pr. Jérome LARGHERO Rapporteurs : Dr. Joanna FOMBONNE et Dr. Laurent BARTHOLIN Examinateur : Dr. Ama GASSAMA-DIAGNE Directeur de thèse : Dr. Alain MAUVIEL

Remerciements

Tout d'abord, je voudrais adresser mes remerciements au **Pr. Jérôme LARGHERO**, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de ma thèse, ainsi qu'au Dr. **Joanna FOMEBONNE** et au **Dr. Laurent BARTHOLIN** qui ont accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je tiens aussi à remercier **Dr. Ama GASSAMA-DIAGNE** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à **l'institut Curie** pour le cadre propice à la recherche qu'il offre aux doctorants et pour le soutien financier que j'ai reçu pour prolonger mon travail de thèse.

Je suis très reconnaissant au **Dr. Alain MAUVIEL**, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe durant ces quatre dernières années, pour la qualité de son encadrement, sa disponibilité, ses conseils avisés et sa contribution dans ma formation. Je me souviendrai aussi de des très belles photos animalière, des sketchs de Coluche et de quelques contrepetries.

I would like to thank Dr. **Edward B**. Leof for welcoming me to his laboratory during my visit to Mayo Clinic (MN, USA). A big thank you goes also to all his team and in particular **Dr**. **Xuequian YIN**, for the quality of her supervision, and **Dr**. **Danielle Hernandez** for her kindness and touristic recommandations and for helping me experience several aspects of the American lifestyle.

J'associe à ces remerciements tous les membres de **l'équipe Mauviel** pour l'ambiance conviviale : les pots (pour lesquels on s'invente des raisons !), le sacré cahier des blagues et des anecdotes (auquel il faudra ajouter une clause de confidentialité !), les fous rire et les moments de culture générale. Je suis particulièrement très reconnaissant au duo de choc, les inséparables : Dr. **Véronique MARSAUD**, la Reine du Western Blot, et Madame **Cristèle GILBERT**, alias CriCri, pour leur qualité d'écoute, leur patience et leurs précieux conseils sur le plan à la fois professionnel et personnel. Un grand merci à mon professeur d'université et maintenant mon collègue, **Dr. Laurence MERY**, pour son grand cœur et sa grande gentillesse, son sens de l'écoute (confidente de tous!), et ses mots apaisants et optimistes qui me donnaient du courage. Je remercie également, Dr. **Delphine JAVELAUD** pour sa participation à mon encadrement pendant mes stages de master 1 et 2, pour nos discussions de science, de politique et de sport. Un petit remerciement en plus pour mes relecteurs : **Véronique MARSAUD** et **Laurence MERY** qui ont contribué à la correction et la finalisation de ce manuscrit.

Je remercie tous les membres de l'Institut Curie que j'ai eu la chance de côtoyer :

Madame Véronique PIVEUX pour sa réactivité, sa bonne humeur et son aide précieuse pour remplir la tonne de formulaires administratifs ; Dr. Celio POUPONNOT, mon tuteur préféré, pour toutes les discussions scientifiques et autres, son humour toujours au rendez-vous ; Amin Essid (sans le « e » !) pour ses encouragements, sa bonne humeur et pour nos pauses café qui m'ont permis de décrocher de temps en temps.

For creating a rich scientific and pleasant social life at Curie Orsay, I would like to thank all my friends who are or were part of the Re-Si-Pi (Research, Science and Pizza !), the Happy Friday and The VIP After-works : **Michael HAMM, Elena SENA, Charlène ESTRADA, Mansour ALKOBTAWI, Zackie AKTARY, Sofia FERREIRA, Maria KOZLAK, Marco ZANINI, Julie TALBOT**. A special thank you goes to my friend Dr. **Puja SINGH** for her kindness even when I didn't deserve it, and for my freshly graduated friend Dr. **Anissia AIT-SAADA** for her fine Algerian cuisine and the laughter we've shared in difficult moments of our PhD.

Je remercie beaucoup mes amis du Magistère (**P18** au top !) et les Trois Mousquetaires : **Soumaya, Robin et Lilia**, qui m'ont soutenu pendant ces dernières années et qui ont supporté mon absence et mes annulations. J'espère pouvoir enfin vous retrouver ! I would like also to thank my friends **Elizana** and **Marketa** for their support and unwavering optimism that has often soothed and encouraged me. A special thank you goes to **Rebekah** for her joy of life, her kindness, the awesome Frisbee sessions and much more.

Je n'oublie pas de remercier les **BLOCH** : **Gilles, Marie-Claude, Solal et Hélène** de m'avoir accueilli dans leur famille pendant plusieurs années. Je suis particulièrement reconnaissant à Marie Claude pour sa gentillesse et ses encouragements au quotidien.

Mes sincères remerciements vont à ma petite famille : **mon père Jomaa, ma mère Najet**, et **ma petite sœur Maha**, pour leur soutien inconditionnel et pour être toujours présents même à distance. Je remercie également ma grande famille, mes tantes, mon oncle et mes cousins, pour leur soutien et leur amour.

Merci à vous tous !

Résumé

Les contacts cellule-cellule activent des signaux contrôlant le processus d'inhibition de contact, un phénomène par lequel les cellules normales cultivées en monocouches présentent une prolifération réduite, voire un arrêt de croissance, lorsqu'elles atteignent la confluence. Ceci est en partie dû à l'activation de la voie Hippo qui entraîne la phosphorylation et l'exclusion nucléaire des co-activateurs transcriptionnels YAP et TAZ. Ce processus physiologique est crucial pour le maintien de l'homéostasie tissulaire et est souvent perdu au cours de la progression néoplasique ou de la transformation in vitro.

Le facteur de croissance transformant ß (TGF-ß) est une cytokine qui joue aussi un rôle pléiotropique dans l'homéostasie et la carcinogenèse. Contrairement à la voie de l'Hippo, sa voie canonique est initiée par l'activation des récepteurs membranaires, qui phosphorylent ensuite les facteurs de transcription cytoplasmiques SMADs, conduisant à leur translocation nucléaire et à l'induction des gènes cibles du TGF-ß. La densité cellulaire et la signalisation d'Hippo ont été rapportées comme bloquant les réponses du TGF-ß, par la capacité du phospho-YAP/TAZ à séquestrer les complexes SMAD activés par le TGF-ß dans le cytoplasme. Ainsi, le but de mon projet était d'étudier l'interaction entre la voie Hippo et la voie TGF-ß dans le contexte de la densité cellulaire.

Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré que, bien que l'activation de la voie Hippo par la densité cellulaire se produise dans les cellules épithéliales et non épithéliales, le blocage de la voie TGF-ß se produit uniquement dans les cellules épithéliales polarisées. En outre, nous avons fourni des preuves que la polarisation des cellules épithéliales interfère avec la signalisation du TGF-ß bien en amont et indépendamment de la localisation de YAP/TAZ. Nos résultats ont conduit à l'établissement d'un nouveau modèle, spécifique aux cellules épithéliales polarisées, où le scellement de la perméabilité paracellulaire empêche le ligand de TGF-ß sécrété apicalement d'accéder à ses récepteurs qui sont retenus au domaine basolatéral de la membrane cytoplasmique.

Dans la seconde partie de ce manuscrit, basée sur la caractérisation des paramètres biophysiques liés à la fonction barrière de l'épithélium, nous avons démontré que la mesure de la perméabilité trans-épithéliale (TER) pouvait être utilisée comme outil de suivi et de vérification de la polarité des épithéliums étanches. Considérant l'implication des jonctions serrées (JSs) dans la polarité épithéliale, nous avons examiné le rôle de l'une de ses protéines cytoplasmiques, ZO-1. Nos résultats ont montré que ZO-1 n'est pas nécessaire pour les fonctions de barrière et de clôture des JSs dans les cellules EpH4 polarisées. Ainsi, nous concluons que ZO-1 n'est pas un bon marqueur de la polarité des cellules épithéliales et n'est pas essentiel pour leur résistance au TGF-ß apical.

Mots-clefs : TGF-ß, Hippo, épithélium, polarité apico-basale, Jonctions serrés, ZO-1.

Abstract

Cell-cell contacts drive signals controlling the process of contact inhibition, a phenomenon whereby normal cells grown in monolayers exhibit reduced proliferation, even growth arrest, when reaching confluency. This is in part due to the activation of the hippo pathway that drives the phosphorylation and nuclear exclusion of the transcriptional coactivators YAP and TAZ. This physiological process is crucial for the maintain of tissue homeostasis and it's often lost during neoplastic progression or in vitro transformation.

The transforming growth factor ß (TGF-ß) is a cytokine that also plays a pleiotropic role in homeostasis and carcinogenesis. Unlike The Hippo pathway, its canonical pathway is initiated by the activation of membrane receptors, which then phosphorylate the cytoplasmic transcription factors SMADs, leading to their nuclear translocation and the induction of TGF-ß target genes. Cell density and Hippo signaling have also been reported to block TGF-ß responses, based on the ability of phospho-YAP/TAZ to sequester TGF-ß-activated SMAD complexes in the cytoplasm. Thereby, my project's aim was to investigate the interaction between the Hippo and the TGF-ß pathways in the context of cell density.

In the first part of this study, we demonstrated that, although the activation of Hippo pathway by cell density occurs in both epithelial and non-epithelial cells, the blocking of TGFß pathway only occurs in polarized epithelial cells. Furthermore, we provided evidence that epithelial cell polarization interferes with TGF-ß signaling well upstream and independent of YAP/TAZ localization. Our results have led to the establishment of a new model specific to polarized epithelial cells where the sealing of the para-cellular permeability prevents the apicaly secreted TGF-ß ligand from accessing its receptors which are retained at the basolateral domain of the cytoplasmic membrane.

In the second part of this work, based on the characterization of the biophysical parameters related to the barrier function of the epithelium, we demonstrated that the measurement of Trans-epithelial permeability (TER) could be used as a tool to monitor and verify the polarity of tight epithelia. Considering the involvement of tight junctions (TJs) in epithelial polarity, we examined the role of one of its cytoplasmic proteins, ZO-1. Our results showed that ZO-1 is not required for either the TJs barrier or the fence functions in polarized EpH4 cells. Thus, we conclude that ZO-1 is not a good marker of fully polarized epithelial cells and is not essential for their resistance to apical TGF-ß.

Keywords : TGF-ß, Hippo, epithelium, apico-basal polarity, Tight Junctions, ZO-1.

Table des matières

Liste des abréviations	11
Liste des figures	13
INTRODUCTION	
Chapitre 1 : La voie TGF-β	
I. La sous-famille TGF-ß	
1. Les ligands	19
2. Les récepteurs	21
II. Voie de signalisation TGF-ß	24
1. La voie canonique du TGF-β	24
a. Les SMADs	24
b. La cascade de signalisation canonique du TGF-ß	
2. Les voies non canonique du TGF-ß	
a. La voie des MAPK	
D. La Vole des GTPases Rito	
1 Le TGE-ß comme suppresseur de tumeur	
2 Le rôle pro-tumoral du TGE-R	
IV Régulation de la voie TGF-R	35
1. La régulation de la disponibilité du ligand	
 La régulation de la disponibilité des récepteurs 	
3. La régulation de l'activité R-SMAD	
4. La modulation de la voie TGF-ß par des composés pharmacologiques	
5. La modulation de la voie TGF-ß par d'autres voies de signalisation	
Chapitre 2 : La voie Hippo	
I. La voie de signalisation Hippo chez les mammifères	45
II. Les substrats de la voie Hippo : YAP et TAZ	47
III. La régulation de la voie Hippo	51
1. Modules dépendants des contacts Cellule-Cellule	51
a. Les protéines du domaine FERM	51
 b. Les jonctions intercellulaires et les complexes de polarite Madulas life à la tagaine acésanime. 	
 Modules lies a la tension mecanique Los fostoure colubles 	54 56
5. Les lacteurs solubles	
Chapitro 3 : La polaritó anico hasalo dos collulos ónithólialos	
Chaptere 5 : La polarite apico basale des cendres epithenales	
1. La structure epititeriale	
 2 l'établissement de la nolarité anico-basale 	
a. Les protéines impliquées dans l'établissement de la polarité apico-basale	
b. Le rôle de l'adhérence cellulaire dans l'établissement et le maintien de la polarité	72
c. Le renouvèlement de l'épithélium et la polarité apico-basale	72
II. Les jonctions serrées – acteur majeur de la polarité apico-basale	75
1. Découverte des jonctions serrées	75
2. Composition moléculaire des jonctions serrées	77
3. Rôles des jonctions serrées	80
III. La protéine ZO-1	
1. Structure de la protéine ZO-1	
2. Les fonctions de ZO-1	
 a. Role dans la formation des jonctions serrees et l'établissement de la polarité apico-ba b. Autros fonctions de ZO 1 	sale83
D. AUTES IONCIONS DE 20-1	

IV. L'impact de la polarité polarité apico-basale sur la voie TGF-ß
Objectifs et travaux réalisés durant la thèse
RESULTATS
DISCUSSION
 I. Le rôle de la polarité apico-basale dans la modulation de la voie TGF-ß dans les cellules épithéliales
 III. Caractérisation de l'établissement de la polarité apico-basale
 V. Conclusion generale
• Tester l'invalidation de ZO-1 dans d'autres types cellulaires que EpH4, et la redondance entre ZO-1 et ZO-2
Annexes
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES159

Liste des abréviations

293T	Sub-line of adenovirus-immortalized human embryonic kidney cells with
	a gene encoding the SV40T-antigen and a neomycin resistance gene.
ABR	Actin Binding Region
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFT-2	Iron-regulated transcriptional activator
AJs	Adherens Junctions
ALK-3/6	Activin receptor-Like Kinase
ADM	Acinar-to-Ductal Metaplasia
AMOT	Angiomotin
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CDK	Cyclin-Dependent protein Kinase
CRM-1	Chromosome Region Maintenance 1
Co-SMAD	Common-mediator SMAD
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAPK	Death Associated Protein Kinase
DEC1	Differentially Expressed in Chondrocytes 1
DLG	Discs Large
EGF	Epidermal Growth Factor
EpH4	Nontumorigeniccell line derived from spontaneously
·	immortalized mouse mammary gland epithelial cells
FAK	Focal Adhesion Kinase
FERM	4.1 protein, Ezrin, Radixin, Moesin
FoxO	Forkhead box O
GDF	Growth and Differentiation Factor
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GPCR	G Protein-Coupled Receptors
GTP	Guanosine TriPhosphate
HepG2	Human liver cancer cell line
hESC	human Embryonic Stem Cells
HPO	Нірро
hTERT	human Telomerase Reverse Transcriptase
I-SMADs	Inhibitory SMADs
ID1	Inhibitor of DNA binding 1
JAM	Junctional Adhesion Molecule
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KRAS	Kirsten RAt Sarcoma 2 viral oncogene homolog
LAP	Latency Associated Peptid
LATS1/2	Large Tumor Suppressor kinase 1/2
LFF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
Løl	Lethal giant larvae
-o. I TBP	Latent TGF-& Binding Protein
LTGF-ß	Latent TGF-ß

MAD	Mothers Against Decapentaplegic
MAGUK	Membrane-Associated GUanylate Kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MATS	Mobs-As-Tumor-Suppressor
MCF10A	Human mammary epithelial cell line
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney epithelial cells
MEC	Matrice ExtraCellulaire
MH1/2	MAD homology 1/2
MMP	Matrix MetalloProteinases
MST1/2	Mammalian STerile 20-like kinase 1/2
MTMR4	MyoTubularin Related Protein 4
NES	Nuclear Export Sequence
NF2	NeuroFibromin 2
NLS	Nuclear Localization Signal
NuRD	Nucleosome-Remodeling and histone Desacetylase
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K	PhosphatIdylinositol-3-Kinase
РКА	Protein Kinase A
R-SMADs	Receptor-regulated SMADs
ROCK	RHO-dependent Kinase
SARA	SMAD Anchor for Receptor Activation
Sav	Salvador
SCIB	Scrible
SMAD	fusion of Caenorhabditis elegans Sma genes and the Drosophila Mad,
	Mothers against decapentaplegic
SMURF1/2	SMad Ubiquitination Regulatory Factor 1/2
TALENs	Transcription Activator-Like Effector Nucleases
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF-ß	Transforming Growth Factor ß
TSP1	TromboSPondine-1
Tßri	TGF-ß receptor type I
Tßrii	TGF-ß receptor type II
U-1	Unique-1
USP4	Ubiquitin Specific Protease 4
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Wts	Warts
YAP	Yes-Associated Protein 1
ZO-1/2/3	Zona Occludens-1/2/3
ZONAB	ZO-1-associated Nucleic Acid Binding

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Les membres de la super famille TGF-ß.	18
2	Les différentes étapes de la maturation du ligand TGF-β	20
3	Structure des récepteurs TßRI et TßRII	22
4	Structure des protéines SMADs	25
5	Cascade de signalisation canonique de la voie TGF-β	28
6	Différents types d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie TGF-ß	39
7	Le phénotype mutant pour la voie Hippo dans la drosophile et la souris	44
8	Les homologues des composants de la voie Hippo chez les mammifères et leur fonctions	44
9	La voie de signalisation Hippo chez les mammifères.	46
10	Structure de YAP et TAZ, leurs domaines fonctionnels et les sites d'interaction avec d'autres protéines.	48
11	L'effet des modules dépendants des contacts cellule-cellule sur la signalisation Hippo.	55
12	Les différents signaux mécaniques liés à la matrice extracellulaires et affectant l'activité de YAP/TAZ.	55
13	La régulation de la kinase LATS par les différents GPCRs	58
14	La relation contraire, entre l'inhibition de contact et la signalisation	58
	mitogénique et son impact sur la régulation de la voie Hippo.	
15	Le modèle d'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo, proposé par	61
	Varelas et al.	
16	Classification des épithéliums selon la forme (A) et le nombre de couches de cellules (B).	64
17	La structure épithéliale d'un épithélium simple.	67
18	Les étapes de l'établissement de la polarité apico-basale.	71
19	Maintien de la polarité apico-basale lors de la mitose.	74
20	La morphologie des jonctions serrées.	76
21	Schéma du réseau de jonctions serrées au niveau du domaine apical des cellules épithéliales polarisées.	76
22	Les protéines transmembranaires des jonctions serrées.	79
23	Les fonctions principales des jonctions serrées.	81
24	Structure et domaines d'interactions protéiques de ZO-1.	84
25	Modèle décrivant la signalisation TGF-ß dans les cellules épithéliales polarisées.	133
26	Modèle décrivant l'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo en tenant en compte l'impact de la polarité apico-basale sur la signalisation TGF-ß	136
27	Modèle proposé par Varelas et al. illustrant la séquestration cytoplasmique des SMAD2/3-4 actifs par P-YAP/TAZ.	138
28	YAP/TAZ dictent le choix entre le rôle anti et pro-tumoral du TGF-ß.	140
29	ZO-1 n'est pas requise pour la mise en place des fonctions de barrière et de clôture des jonctions serrées lors de l'établissement de la polarité apico-basale.	146

INTRODUCTION

TGF (Transforming Growth Factor) est le terme anglais pour Facteur de Croissance Transformant. Cette appellation est apparue à la fin des années 1970, suite à la caractérisation de peptides, retrouvés dans le surnageant de culture de cellules tumorales, ayant la capacité d'induire la transformation de cellules saines (de Larco and Todaro, 1978).

Le nom « Facteur de croissance transformant » regroupe deux classes de facteurs, TGF- α et TGF- β . Cependant, ces deux facteurs de croissance sont complètement distincts au niveau structurel et des récepteurs impliqués dans leur signalisation. Le TGF- α partage la même structure que les ligands de la voie EGF (Epidermal Growth Factor) et se lie aux récepteurs à l'EGF, alors que le TGF- β se lie aux récepteurs du TGF.

La classe TGF-ß est une superfamille de protéines ayant une structure similaire et partagent les mêmes récepteurs cellulaires. L'appellation TGF-ß est utilisée suite à la découverte en 1983 du premier membre de la famille, le TGF-ß1 (Assoian et al., 1983). Depuis, 34 membres ont été découverts chez l'humain, classés dans quatre sous-familles : la sous-famille TGF-ß, la sous-famille GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor), la sous-famille Activin/Inhibin et la sous-famille BMP/GDF (Bone Morphogenetic Proteins/Growth and Differentiation Factor) (Figure 1).

I. La sous-famille TGF-ß

Historiquement, le TGF- β a été d'abord considéré comme un facteur de croissance transformant. Depuis, il a été montré que le TGF- β n'est pas un simple facteur de croissance mais une cytokine pleïtropique.

Différents types cellulaires étant capables d'exprimer le TGF- β et ses récepteurs, cette cytokine possède une multitude d'actions possibles. En effet, le TGF- β contrôle de nombreux



Figure 1 : Les membres de la super famille TGF-ß. La super famille TGF-ß comporte 34 membres, classés en quatre sous-familles : la sous-famille TGF-ß, la sous-famille GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor), la sous-famille Activine/Inhibine et la sous-famille BMPs/GDF (Bone Morphogenetic Proteins/Growth and Differentiation Factor). D'après (Ralf Weiskirchen et al 2009).

processus physiologiques de la cellule, de manière pléïotrope, et son action est dépendante du type cellulaire, de l'état de différenciation de la cellule et de son environnement (Massague, 1996). Il est impliqué dans la croissance et la différenciation cellulaire, la régulation de l'inflammation et la cicatrisation des lésions. L'altération de cette voie de signalisation est impliquée dans plusieurs pathologies telles que le cancer, la fibrose ainsi que des désordres vasculaires et immunitaires.

1. Les ligands

Chez les mammifères, le TGF- β existe sous 3 isoformes : le TGF- β 1, le TGF- β 2 et le TGF- β 3 codées par 3 gènes distincts et partageant les mêmes récepteurs cellulaires. Ces isoformes sont très proches structurellement: 9 résidus cystéines conservés, 80% d'homologie de séquence. Cependant, l'expression et l'effet de chaque isoforme sont spécifiques, et varient selon le type cellulaire, le stade de développement et les conditions physiopathologiques environnementales.

Le ligand TGF-ß est produit sous forme d'une pré-protéine, appelée pro-TGF-ß, associée en dimères par des ponts disulfures, et ayant un poids moléculaire de 75KDa. Cette dernière est constituée d'un peptide signal, en région N-terminale, d'une région centrale de latence LAP (Latency Associated Peptide) et d'une région C-terminale contenant la forme active du TGFβ. Le peptide signal est éliminé par clivage par la Furine, protéase de la famille des convertases, permettant ainsi la sécrétion de la forme latente du TGF-ß (Dubois et al., 2001; Dubois et al., 1995).

Bien que la synthèse du TGF- β et l'expression de ses récepteurs soient universelles, l'activation quant à elle, est localisée aux sites où le TGF- β est libéré de la latence (Figure 2). Stocké au niveau de la matrice extracellulaire, la forme mature sécrétée du TGF- β n'est pas biologiquement active. Il s'agit encore d'un précurseur latent LTGF- β (Latent TGF- β), appelé aussi « petit complexe latent » d'une taille de 390 à 414 acides aminés en fonction de l'isoforme (Roberts, 1998). A son tour, le LTGF- β s'associe au LTBP (Latent TGF- β Binding Protein) formant un « grand complexe latent » (Large Latent Complex) (Shi et al., 2011; ten Dijke and Arthur, 2007). La libération du TGF- β actif se fait, en partie, par un clivage protéolytique des LAPs et des LTBPs via des protéases de la matrice extracellulaire.



Figure 2 : Les différentes étapes de la maturation du ligand TGF- β **.** Adapté de (Gressner et al., 2002). Le TGF- β est exprimé sous la forme d'un peptide non mature. Ce dernier subit un clivage par la Furine permettant l'ajout de ponts disulfures et la formation d'un dimère. Avant sa sécrétion, chaque dimère de TGF- β se lie à un premier élément de latence, le LAP, pour former le « petit complexe de latence ». Ce complexe non actif, s'associe dans l'espace extracellulaire à un deuxième élément de latence, le LTBP, formant ainsi le « grand complexe latent ». La libération du TGF- β actif se fait, en partie, par un clivage protéolytique des LAPs (Latency Associated Peptide) et des LTBPs (Latent TGF- β Binding Protein) via des protéases de la matrice extracellulaire.

En effet, la Trombospondine-1 (TSP1) et l'intégrine alphavβ6 agissent sur la conformation des complexes latents afin de libérer le TGF-ß actif (Buscemi et al., 2011). Le TGF-β actif est un homodimère de 25 KDa.

L'isoforme TGF-β1, dénommée TGF-β dans ce manuscrit, est présente chez de nombreuses espèces (humains, souris, singes...), et exprimée par une grande variété de cellules (endothéliales, hématopoïétiques et dans les cellules du tissu conjonctif...). Le séquençage du gène TGF-ß1 a montré une grande homologie au sein du groupe des mammifères. Chez l'humain, ce dernier est localisé sur le chromosome 19 au locus 19q13 et se divise en 7 exons et 6 introns. *In vivo*, les souris invalidées pour TGF-ß1 présentent une mortalité de l'ordre de 50% des fœtus 10,5 jours après la fécondation. Ces souris développent également une inflammation massive et létale de nombreux organes à partir de l'âge de trois semaines. Ceci suggère que le TGF-ß1 est impliqué dans le contrôle de l'inflammation et de l'immunité (Bottinger and Kopp, 1998; Shull et al., 1992).

2. Les récepteurs

Il existe 3 types de récepteurs au TGF- β : les récepteurs de type I, II et III. Dans certaines cellules le TGF- β se lie au récepteur de type III, un protéoglycane transmembranaire appelé β -glycan, qui formera un complexe avec les récepteurs au TGF- β de type II et I afin de leur présenter le ligand (Shi and Massague, 2003). Cependant, ce récepteur n'est présent que dans certains types cellulaires, ainsi seuls les récepteurs de type I (T β RI) et de type II (T β RII) sont essentiels à la signalisation du TGF- β . Ces deux récepteurs sont des glycoprotéines transmembranaires de 55KDa et 70KDa, respectivement. Ils présentent une forte homologie structurale et possèdent un peptide signal, un domaine extracellulaire de liaison au ligand, un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire doué d'une activité serine/thréonine kinase (Figure 3).

L'activité kinase de T β RII est constitutive, alors que celle de T β RI s'active seulement suite à une phosphorylation du récepteur. En effet, la fixation du ligand sur T β RII induit un

21



Figure 3 : Structure des récepteurs TßRI et TßRII. GS : domaine riche en Gly/Ser/Thr, de séquence TTSGSGSG. Adapté de (Huse et al., 2001).

changement de conformation du récepteur TßRII, et par conséquence, l'autophosphorylation de son domaine kinase. Au niveau de sa structure, le récepteur TßRI se différencie du récepteur TßRII par la présence d'une région intracellulaire de 30 acide aminés précédant immédiatement le domaine kinase : le domaine GS (riche en Gly/Ser/Thr, de séquence TTSGSGSG), cible du domaine kinase de TßRII. La phosphorylation du domaine GS de TβRI par TßRII induit un changement de conformation et une activation du domaine kinase de TβRI.

Les récepteurs subissent un recyclage à la fois dépendant et indépendant de leur activation par le ligand, les taux d'internalisation et de recyclage n'étant pas affectés par la liaison du ligand (Dore et al., 2001; Massague and Like, 1985). Des études ont montré que le recyclage des récepteurs du TGF-ß se produit après leur internalisation dans des vésicules recouvertes de clathrine, suivie par leur renvoi à la membrane plasmique par un mécanisme dépendant de la protéine rab11 (Ras-related protein Rab-11) (Mitchell et al., 2004). Rab11 est une des petites protéines G de la superfamille des protéines Ras connue pour son rôle de régulateur de l'expression membranaire des récepteurs et des protéines d'adhérence.

Bien que l'activation des récepteurs se fasse à la surface de la cellule, la transmission du signal vers les SMADs nécessite une étape d'internalisation des récepteurs (Di Guglielmo et al., 2003; Penheiter et al., 2002). Une fois le ligand lié aux récepteurs du TGF-ß, ces derniers quittent donc la membrane cytoplasmique par endocytose, ce qui engendre une régulation négative du nombre de récepteurs disponibles. L'internalisation des récepteurs est décrite comme un évènement requis pour l'activation de la voie TGF-ß. Cet événement est rapide puisqu'il a lieu dans les 10 minutes qui suivent l'ajout du ligand TGF-ß, comme le montre une étude utilisant des cellules 293T transfectées avec TßRI et TßRII (Zwaagstra et al., 2001).

En plus de leur activité sérine/thréonine kinase, les récepteurs T&RI et T&RII possèdent une activité tyrosine kinase impliquée dans l'activation des voies de signalisation non canoniques (Lee et al., 2007). Par conséquence, la nature de la voie de signalisation activée, canonique ou non canonique, suite à la fixation du ligand TGF-ß à ses récepteurs dépend du type de l'activité kinase de T&RI et T&RII.

II. Voie de signalisation TGF-ß

1. La voie canonique du TGF-β

La diversité des effets cellulaires du TGF- β peut être expliquée par sa capacité à activer plusieurs voies de signalisation, telles que la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), la voie des GTPases Rho et la voie PI3K/AKt. La voie canonique du TGF- β , étudiée durant ma thèse, est responsable de la majorité de la réponse cytostatique à la stimulation par le TGF- β et implique une transduction du signal *via* les protéines SMADs.

a. Les SMADs

Les protéines SMAD ssont les orthologues des vertébrés de la protéine MAD (Mothers Against Decapentaplegic) chez la Drosophile, le premier médiateur identifié de la voie TGF-ß (Sekelsky et al., 1995). Ce sont des protéines intracellulaires impliquées dans la voie de signalisation canonique du TGF-ß et qui permettent la transduction du signal des récepteurs activés au noyau, conduisant à l'activation de la transcription de gènes cibles. Les protéines SMADs comportent deux régions homologues en N-terminal et en C-terminal. Ces domaines sont appelés respectivement MH1 (MAD homology 1) et MH2 et sont séparés par une région charnière moins bien conservée (Figure 4). Le domaine MH1 est essentiellement impliqué dans la liaison à l'ADN, alors que le domaine MH2 est nécessaire pour l'interaction des protéines SMADs entre elles et pour la liaison aux co-activateurs et aux co-répresseurs de transcription (Shi and Massague, 2003). Sur la base de considérations structurelles et fonctionnelles, les protéines SMADs ont été divisées en trois catégories : les R-Smad (receptor-regulated SMADs), les Co-SMAD (common-mediator Smad) et les I-SMADs (Inhibitory Smads).

Les R-Smad (Receptor Regulated SMADs), Smad2 et Smad3, se lient et sont directement phosphorylées par le récepteur TßRI. Les R-SMADs partagent deux domaines conservés, les domaines MH (MAD Homology) : MH1 au niveau de N-terminal et MH2 au niveau de Cterminal. Ces deux domaines sont séparés par une région centrale appelée « Linker » qui varie en longueur et composition entre les différents R-SMADs. Dans le cytoplasme, Smad2

24



Figure 4 : Structure des protéines SMADs. NLS (Nuclear Localization Signal) : signal de localisation nucléaire ; DNA-Binding : séquence d'interaction avec l'ADN ; SXS (Ser-X-Ser) : motif de phosphorylation par le récepteur TßRI.

et Smad3 interagissent avec les protéines SARA (SMAD anchor for receptor activation), ce qui permet leur recrutement par le récepteur TßRI. Suite à la liaison entre le ligand TGF-ß et ses récepteurs, les R-SMADs sont phosphorylés par TßRI au niveau du motif Ser-X-Ser (SXS) à l'extrémité C-terminale. Cette phosphorylation provoque leur dissociation de la protéine SARA, leur permettant de s'associer au Co-SMADs afin de transloquer dans le noyau et jouer le rôle de facteurs de transcription. Toute seule, une protéine R-Smad a une spécificité relativement faible pour l'ADN, la coopération entre les R-SMADs et entre les R-Smad et les co-facteurs de transcription est nécessaire pour l'induction des gènes cibles de la voie TGF-β. La variabilité de ces co-facteurs d'une lignée cellulaire à une autre, pourrait expliquer la diversité tissulaire des gènes cibles du TGF- β (Shi and Massague, 2003). Les R-Smad interagissent avec des co-activateurs et des co-représseurs, ce qui leur permet d'activer ou d'inhiber l'expression des gènes selon le co-facteur. Dans le cas particulier du facteur de transcription AP-1 (activation protein 1), la modulation de l'activité transcriptionnelle de SMAD2/3 n'est pas le résultat d'une interaction directe entre les deux complexes au niveau de l'ADN, mais est plutôt due à une modulation dynamique dépendante de la fixation de SMAD2/3 et/ou AP-1 aux séquences cis des gènes cibles du TGF-ß (Verrecchia et al., 2001).

Le Co-Smad (common-Smad), Smad4, est commun aux cascades initiées par les TGFβ/activine et les BMP, et s'associe avec les R-Smad. Smad4 est la seule protéine Co-Smad identifiée chez les vertébrés. Elle contient les domaines MH1 et MH2 mais pas le motif SSXS, et elle n'est donc pas phosphorylée par le récepteur TßRI. Chez l'humain, le locus SMAD4 est souvent supprimé ou muté dans le cancer du pancréas et du côlon (Levy and Hill, 2006; Mehrvarz Sarshekeh et al., 2017). Des expériences réalisées sur des modèles de souris invalidées pour SMAD4 ont démontré une tumorigénicité accrue dans plusieurs organes, γ compris les tissus cutanés (Qiao et al., 2006; Yang et al., 2005). Cependant, l'inhibition de l'expression de SMAD4 dans des cellules cancéreuses du pancréas ou dans des kératinocytes humains, suggère que certains gènes cibles du TGF-ß sont induits même en l'absence de Smad4 (Jazag et al., 2005; Levy and Hill, 2005).

Les I-SMADs (inhibitory SMADs), SMAD6 et SMAD7, inhibent la transduction du signal, en bloquant la phosphorylation des R-SMAD par le récepteur de type I du TGF- β , ou en induisant la dégradation de celui-ci par le recrutement des protéines ubiquitine-ligases SMURF1/2 (SMad Ubiquitination Regulatory Factor 1/2). Smad6 inhibe préférentiellement la

26

signalisation SMAD par les récepteurs BMP de type I ALK-3 et ALK-6 (Goto et al., 2007), tandis que Smad7 inhibe à la fois la signalisation SMAD induite par le TGF-ß et par le BMP (Hanyu et al., 2001). Au niveau de leur structure, les I-SMADs ne possèdent que le domaine MH2 en commun avec les R-SMADs et les Co-SMADs.

b. La cascade de signalisation canonique du TGF-ß

Comme décrit précédemment, la voie de signalisation canonique du TGF-ß est initiée quand la forme active du TGF- β (homodimère de 25 KDa) se lie au récepteur de type II (T β RII) formant ainsi un complexe hétérodimérique (Derynck and Zhang, 2003) (Figure 5). Le récepteur de type I (T β RI) est alors recruté au niveau du complexe TGF- β /T β RII, pour former des complexes hétéro-tétramériques composés de deux hétérodimères T β RII/T β RI liant des dimères de TGF- β . Au niveau de ces complexes, le récepteur T β RII phosphoryle le récepteur T β RI, ce qui permet d'induire son activité kinase. L'activation du récepteur I permet la transduction du signal en phosphorylant les protéines SMADs sur leur domaine MH2 au niveau du motif SSXS (Shi and Massague, 2003).

Les SMADs associées aux récepteurs (R-SMADs) sont séquestrées dans le cytoplasme en l'absence de signal. Après liaison du TGF β sur son récepteur, l'activation de T β RI conduit à la phosphorylation de Smad2 et/ou Smad3. Cette phosphorylation provoque leur dissociation du récepteur T β RI, et leur association avec Smad4. Ces complexes de R-SMADs et co-SMADs transloquent dans le noyau par un processus actif, contrôlé par Ran et les importines (Chen and Xu, 2011). Smad4 est importé dans le noyau uniquement lorsqu'il est associé à SMAD2/3, alors que les R-SMADs peuvent être importés dans le noyau en absence de Smad4. Cependant, Smad4 est nécessaire pour la transcription de certains gènes cibles du TGF- β

Une fois dans le noyau, les complexes R-SMADs/Co-SMADs se lient directement à l'ADN ou en association avec d'autres facteurs et co-facteurs de transcription, ce qui augmente l'affinité de cette liaison (Shi and Massague, 2003). En se liant à l'ADN au niveau des sites SBE (Smad Binding Element) composés de la séquence CAGACA, ces complexes régulent

27



Perrot et al., Pharmacology and Therapeutics, 2013

Figure 5 : Cascade de signalisation canonique de la voie TGF-β. La signalisation TGF-ß est initiée lorsque le ligand TGF-ß se lie à ses récepteurs au niveau membranaire. Ces derniers, doués d'une activité sérine/thréonine kinase, phosphorylent les protéines cytoplasmiques SMAD2/3 permettant leur association avec les protéines SMAD4. Les complexes SMAD2/3-SMAD4-transloquent dans le noyau afin d'agir comme un facteur de transcription au niveau des promoteurs des gènes cibles du TGF-ß. D'après (Perrot et al., 2013).

l'expression des gènes cibles de la voie TGF- β tels que Gli2 et PAI (Jonk et al., 1998; Shi and Massague, 2003). L'activation de la transcription implique la participation du co-activateur CBP/P300 (Inoue et al., 2007; Janknecht et al., 1998), alors que la répression de la transcription fait intervenir les co-répresseurs Ski et SNO (Deheuninck and Luo, 2009).

2. Les voies non canonique du TGF-ß

Dans ce projet nous nous sommes intéressés à l'étude de la voie canonique, SMADs dépendante, du TGF-ß et sa modulation par la polarité apico-basale. Cependant, les SMADs ne sont pas les seuls moyens par lesquels le TGF-β régule les fonctions cellulaires : il est également capable d'activer des cascades de signalisations indépendantes des protéines SMADs. Certaines de ces voies non canoniques ont la particularité de pouvoir agir sur la polarité apico-basale. Deux de ces voies sont développées à titre d'exemple : la voie MAPK et la voie des GTPase Rho.

a. La voie des MAPK

Les Mitogen-activated protein kinases (MAPK) constituent une superfamille de protéines qui transmettent les signaux extracellulaires au noyau pour réguler la transcription des gènes impliqués dans un large éventail de processus cellulaires, y compris la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Chapnick et al., 2011). Les MAPK se composent de trois sous-familles principales: Les kinases ERK 1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase), les kinases de stress JNK1/2/3 (c-Jun N-terminal kinase) et p38-MAPK (Chang and Karin, 2001). Ces sous-familles peuvent être activées par plusieurs molécules extracellulaires, telles que les cytokines TGF- β . L'induction rapide de l'expression de la protéine RAS par le TGF- β a été observée dès 1992 dans l'intestin de rat (Mulder and Morris, 1992). Il a été démontré depuis que le TGF- β est capable d'activer les voies ERK, JNK, et p38-MAPK dans de nombreuses lignées cellulaires de façon dépendante ou indépendante des protéines SMADs (Mao et al., 2011; Zhang, 2009). Le ligand TGF- β peut induire l'activation de ERK dans les cellules épithéliales normales et cancéreuses (Frey and Mulder, 1997). Cette régulation dépend du recrutement et de l'activation du complexe ShcA/Grb2/Sos T β RI, qui active à son tour la cascade de signalisation RAS/RAF/MEK1/2 (Lee et al., 2007; Rojas et al., 2009). T β RI peut

aussi interagir avec TRAF6 et provoquer soit son auto-ubiquitination, activant par conséquence la voie de signalisation TAK1-JNK (Sorrentino et al., 2008), ou l'activation de p38 à travers l'activation de TAK1.

Plusieurs membres de la famille MAPK sont impliqués et nécessaires pour l'induction de la TEM (Transition épithélio-Mésenchymateuse) induite par le TGF-ß (Gui et al., 2012). En effet, dans les cellules épithéliales des glandes mammaires de souris, l'induction de la TEM est associée à une induction de la transcription de plusieurs composants de signalisation MAPK, y compris Ras, Mek1/2 et Erk1/2 et l'activation de Erk1 (Xie et al., 2003; Xie et al., 2004). L'activation de ERK par la voie TGF-ß est requise pour le désassemblage des jonctions adhérentes ainsi que la motilité cellulaire lors de la TEM (Xie et al., 2004; Zavadil et al., 2001).

b. La voie des GTPases Rho

Les GTPases de la famille Rho (Ras homologue) sont une famille de petites protéines G et constituent un sous-groupe de la superfamille Ras. Chez les mammifères, 22 protéines Rho ont été découvertes, ayant un rôle dans la dynamique du cytosquelette d'actine, le transport de vésicules et le contrôle du cycle cellulaire.

RhoA, Rac et Cdc42 sont les trois membres les plus étudiés de cette famille et peuvent toutes être activées directement par le TGF-ß (Zhang, 2009). Plusieurs études suggèrent que l'activation de RhoA par TGF- ß est indépendante de Smad2 ou Smad3, comme le montrent l'incapacité du mutant dominant négatif Smad3 ou la déplétion de Smad4 à bloquer l'activation RhoA induite par le TGF-ß (Bhowmick et al., 2001; Voorneveld et al., 2014). De même que pour l'activation de RhoA, l'activation de Cdc42 se produit indépendamment de SMADs (Wilkes et al., 2003). Paradoxalement, il a été montré que le TGF-ß régulait à la baisse les niveaux de protéine RhoA par l'intermédiaire de Par6, une protéine d'échafaudage impliquée dans la polarité apico-basale des cellules épithéliales polarisées. En effet, la protéine Par6, en coopération avec la Smurf1, induit la dégradation de RhoA provoquant la destruction des jonctions serrées (Ozdamar et al., 2005).

III. Le TGF-ß et le développement tumoral

La nature pléiotrope du TGF-ß et ainsi son implication dans plusieurs processus cellulaires, tels que la différentiation, la prolifération et la migration cellulaire, lui donne une importance majeure comme facteur contrôlant la tumorigenèse. Son rôle de suppresseur de tumeur est dû essentiellement à sa capacité à d'une part inhiber la prolifération cellulaire, et à d'autre part induire la mort cellulaire programmée. En revanche, des mutations au niveau des composants de la voie TGF-ß sont souvent associées à une progression tumorale.

1. Le TGF-ß comme suppresseur de tumeur

Le rôle de suppresseur de tumeur du TGF-ß a été démontré par plusieurs études montrant la présence de mutations dans les protéines Smad4, TßRI et TßRII dans un grand nombre de cancers tels que le cancer de l'estomac, du colon, de la prostate, du sein, du foie et du pancréas (Elliott and Blobe, 2005; Levy and Hill, 2006; White et al., 2010). Ces mutations interfèrent avec les différentes fonctions antitumorales du TGF-ß. Dans les cellules épithéliales, le TGF-ß contrôle la prolifération cellulaire en induisant l'arrêt du cycle cellulaire à travers l'induction de l'expression des inhibiteurs des CDKs (Cyclin-Dependent protein Kinase), comme p15 et p21. Il inhibe l'expression des facteurs de transcription qui induisent la prolifération cellulaire, tel que c-myc, DNA-binding-1 ID1 (Inhibitor of DNA binding 1) et ID2 (Hannon and Beach, 1994; Siegel et al., 2003; Yagi et al., 2002). Des oncogènes tels que SKI, MEL1 et BCL6 favorisent le développement tumoral à travers l'inhibition de la voie TGF-ß (Heider et al., 2007; Takahata et al., 2009; Wang et al., 2008).

Outre sa capacité à induire l'arrêt du cycle cellulaire, le TGF- ß inhibe aussi la croissance cellulaire en activant l'apoptose à travers l'induction de protéines pro-apoptotiques comme DAPK (DeathAssociated Protein Kinase) et BIM (Bcl-2-like protein 11) (Ohgushi et al., 2005; Yang et al., 2002). L'induction de l'apoptose dans des cellules d'adénocarcinome canalaire du pancréas a été également mise en évidence par une étude récente menée par David et al. Dans cette étude l'auteur montre que cette induction de l'apoptose est dépendante de la

protéine SMAD4 dont l'absence favorise la progression tumorale par le TGF-ß (David et al., 2016).

Des études suggèrent aussi que le TGF-ß peut induire la senescence des cellules cancéreuses par un mécanisme impliquant l'inhibition de l'expression de la protéine hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), l'unité catalytique de la protéine télomérase qui rallonge et stabilise les télomères des chromosomes (Li and Liu, 2007). En absence de hTERT, dont l'expression est inhibée dans toutes les cellules sauf dans les cellules germinales, les télomères se raccourcissent à chaque division jusqu'à arriver à un état de sénescence suivi par l'apoptose. Cela vise à empêcher la dérégulation de la croissance et de la survie cellulaire. Cependant, dans la majorité des cancers, hTERT est exprimée et la télomérase est réactivée, menant à l'immortalité des cellules cancéreuses et à leur prolifération illimitée (Shay and Bacchetti, 1997). Plusieurs études ont montré que le niveau d'expression du TGF-ß est inversement proportionnel au niveau d'expression de la hTERT dans le cancer du colon et du sein, et que ce dernier inhibe hTERT à travers une interaction directe entre Smad3 et le promoteur de hTERT (Cassar et al., 2017; Li et al., 2006; Yang et al., 2001).

2. Le rôle pro-tumoral du TGF-ß

Alors qu'il joue le rôle d'un suppresseur de tumeur à des stades précoces du développement tumoral, à des stades tardifs l'activation de la voie TGF-ß est fortement corrélée avec la progression tumorale et la présence de métastases, comme dans cas du cancer du prostate et du côlon (Bellam and Pasche, 2010; Cao and Kyprianou, 2015). Le TGF-ß agit par plusieurs mécanismes différents mais complémentaires conduisant à l'augmentation de l'invasion tumorale.

Le TGF-ß est capable d'induire la prolifération de cellules mésenchymateuses, telles que les cellules musculaires lisses et les cellules cancéreuses de gliomes et ostéosarcomes. Il a été montré que l'induction du PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) est à l'origine de cette prolifération (Bruna et al., 2007; Matsuyama et al., 2003). Les mêmes études suggèrent que la régulation épigénétique du promoteur du gène PDGF est capable de dicter le rôle pro-oncogènique du TGF-ß. En effet, l'hypométhylation du promoteur de PDGFB, conduisant à

une augmentation de son induction par le TGF-ß, est associé à un mauvais pronostic dans le cas de gliome.

Il a été aussi montré que le TGF-ß inhibe l'apoptose des cellules de carcinome mammaires chez la souris en induisant l'expression du facteur de transcription DEC1 (Differentially Expressed in Chondrocytes 1) (Ehata et al., 2007). DEC1 a un niveau d'expression élevé dans le cas du cancer du sein (Chakrabarti et al., 2004; Liu et al., 2013), et l'expression d'un dominant négatif de DEC1 empêche, *in vivo*, l'apparition de métastases (Ehata et al., 2007).

En outre, le TGF-ß induit l'invasion et les métastases de plusieurs types de cancer en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Derynck et al., 2001; Zavadil and Bottinger, 2005). La TEM est un processus impliqué aussi bien dans l'embryogenèse que dans des pathologies telles que la fibrose et les métastases tumorales. Au cours de la TEM, les cellules épithéliales perdent leurs jonctions intercellulaires, et ainsi le contact avec les cellules avoisinantes, et acquièrent des phénotypes mésenchymateux incluant la motilité et la capacité d'invasion et d'intravasation. Ces changements de phénotypes font partie des étapes clés du processus métastatique (Gal et al., 2008).

L'induction de la TEM par le TGF- β a d'abord été mise en évidence *in vitro*. Après traitement par le TGF- β , les cellules épithéliales ont évolué d'une forme cubique à une forme allongée et ont montré une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux et une augmentation d'expression des marqueurs mésenchymateux, tels que la fibronectine et la vimentine (Miettinen et al., 1994). Ces changements étaient accompagnés d'une augmentation de la motilité. Depuis, des études de carcinogenèse chimique *in vivo* ont montré que l'activation de l'expression transgénique de TGF- β 1 activé est corrélée à l'évolution de cellules de carcinome à un état plus invasif (Cui et al., 1996).

Plusieurs études ont examiné l'implication des différents composants de la voie canonique du TGF-β dans l'induction de la TEM. Il a été montré que l'expression d'une version activée du récepteur TβRI est suffisante pour déclencher la TEM induite par le TGF-β dans des cellules NMuMG (glande mammaire de souris) (Piek et al., 1999), alors que la forme dominante négative de ce dernier bloque la TEM induite par le TGF-β (Valcourt et al., 2005). De plus, *in vitro*, l'inhibition de TβRI par un inhibiteur chimique bloque partiellement la TEM et favorise la préservation de certaines caractéristiques des cellules épithéliales (Lamouille

33

and Derynck, 2007), tandis que l'interférence avec la fonction T β RI *in vivo* supprime la TEM et diminue la différenciation mésenchymateuse au cours de la formation de valvules cardiaques (Lamouille and Derynck, 2007). De même, la perte du récepteur TGF- β de type II a été associée à une diminution de la TEM dans un modèle de carcinome cutané chez la souris (Han et al., 2005). Diverses études ont exploré les rôles des SMADs dans la TEM induite par le TGF- β . Une expression élevée de Smad2 ou Smad3 en présence de Smad4 induit ou augmente l'induction de la TEM dans les cellules NMuMG (Piek et al., 1999; Valcourt et al., 2005), alors que l'expression des versions dominantes négatives de Smad2 ou Smad3 bloque la TEM induite par TGF- β dans ces cellules. En outre, une étude plus récente suggère que l'absence de SMAD4 favorise l'induction de la TEM par le TGF- β dans des cellules cancéreuses de pancréas de souris (David et al., 2016).

En plus de son effet direct sur les cellules cancéreuses, le TGF-ß affecte également la croissance tumorale grâce à sa régulation du microenvironnement tumoral. La production par les cellules tumorales de TGF- β conduit à l'échappement des tumeurs vis à vis du système immunitaire de l'hôte. Parmi les mécanismes impliqués figure l'inhibition, sous l'effet du TGF-β, de la production par les lymphocytes T de facteurs cytotoxiques tels que les cytokines pro-apoptotiques Fas-ligand et IFN-y (Thomas and Massague, 2005). La modulation de l'expression et de l'activité des protéases de la matrice et de leurs inhibiteurs par le TGF-ß conduit au remodelage matriciel et augmente l'invasivité des cellules tumorales (Festuccia et al., 2000). En effet, il a été montré que le TGF-β induit la sécrétion et l'activation des métalloprotéases matricielle MMP2 (Matrix MetalloProteinases 2) et MMP 9 impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) (Derynck et al., 2001). La stimulation paracrine des cellules stromales conduit également à l'augmentation de la synthèse des protéines de la MEC (laminine, fibronectine, collagènes...) favorisant la migration cellulaire (Gonzalez-Ramos et al., 2013; Roberts et al., 1992; Usui et al., 1998). De plus, le TGF-β stimule à la fois l'angiogenèse tumorale et la croissance tumorale par l'induction des facteurs angiogéniques tels que le facteur de croissance du tissu conjonctif CTGF (Connective Tissue Growth Factor) et le facteur de croissance vasculaire endothélial VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) dans les cellules épithéliales et les fibroblastes (Kang et al., 2003).

L'essentiel du rôle pro-tumoral du TGF-ß consiste en des évènements intervenants à des stades tardifs du développement tumoral. Cependant, une étude plus récente par Chuvrin et al. suggère un modèle dans lequel le TGF-ß joue un rôle pro-tumoral en amont même de l'étape d'initiation du processus tumoral. En effet, il a été montré qu'au niveau du pancréas murin, le TGF-ß induit la dédifférenciation des acini en canaux pancréatiques (ADM : Acinar-to-Ductal Metaplasia). Ce processus est nécessaire dans un contexte de cicatrisation, permettant la génération de cellules progénitrices capables de proliférer. Toutefois, combiné à l'activation de l'oncogène KRAS (Kirsten RAt Sarcoma 2 viral oncogene homolog), les cellules deviennent incapables de se différencier, ce qui favorise par conséquent leur transformation (Chuvin et al., 2017).

IV. Régulation de la voie TGF-ß

La signalisation canonique TGF-ß est une voie de signalisation classique de type linéaire, avec des ligands agissant sur des récepteurs à la surface des cellules. Cependant, sa régulation est complexe et se fait à plusieurs niveaux, allant de la maturation et la sécrétion du ligand, le recyclage et l'activation des récepteurs, la transduction du signal vers les SMADs, à la formation des complexes de transcription avec divers co-represseurs et co-activateurs de transcription.

1. La régulation de la disponibilité du ligand

In vivo, le TGF-β secrété se trouve associé à deux complexes de latence : le « petit complexe latent » ainsi que le « grand complexe latent ». Ces complexes permettent de maintenir le TGF-ß dans un état inactif de manière réversible. La libération du TGF-β actif se fait par un clivage protéolytique des LAPs et des LTBPs *via* des protéases de la matrice extracellulaire. La latence est une étape critique dans le contrôle de l'activité du TGF-ß, elle permet de réguler sa bio-disponibilité, lui permettant d'être stocké au niveau de la matrice extracellulaire, de circuler et d'atteindre les cellules cibles (Annes et al., 2003; Gleizes et al., 1997). Sans cette étape de latence, l'induction autocrine ou paracrine et de façon constante
du ligand TGF-ß de sa voie causerait des pathologies telles que la fibrose et le cancer. La latence est aussi importante en cas de blessure au niveau de l'épithélium, car une induction continue au TGF-ß inhiberait la prolifération cellulaire du nouveau tissu en formation.

2. La régulation de la disponibilité des récepteurs

Comme expliqué dans la section I.2 de ce chapitre, les récepteurs du TGF-ß subissent deux types de recyclage : le recyclage ligand-dépendant et le recyclage constitutif. Le recyclage ligand-dépendant se produit lorsque le ligand TGF-ß se fixe aux récepteurs TßRI et TßRII entrainant leur endocytose. Cette étape est à la fois requise pour la signalisation TGF-ß et permet de réguler le nombre de récepteurs disponibles à la surface de la cellule et ainsi sa sensibilité au TGF-ß. En parallèle, le recyclage constitutif permet aussi à la cellule de contrôler le nombre de récepteurs au TGF-ß à sa surface. Pour une régulation négative, la cellule augmentera le taux d'internalisation des récepteurs et diminuera le taux de recyclage, et inversement pour une régulation positive. De plus, le recyclage constitutif est essentiel pour l'adressage des récepteurs au bon domaine de la membrane cytoplasmique durant et après l'établissement de la polarité apico-basale dans le cas des cellules épithéliales (voir chapitre 3, section IV). Cela n'est pas sans effet sur la disponibilité des récepteurs et joue un rôle important dans le contrôle de la voie TGF-ß.

Après un ou plusieurs cycles de recyclage, les récepteurs du TGF-ß sont dirigés vers une voie d'endocytose distincte de la voie de recyclage et sont dégradés de manière dépendante de la clathrine (Mitchell et al., 2004). Une fois internalisés, les récepteurs sont adressés à l'endosome où ils se dissocient de leur ligand et subissent une dégradation lysosomale. Comme dans le cas du recyclage, la dégradation des récepteurs permet de réguler la voie TGF-ß à travers la disponibilité de ses récepteurs à la surface cellulaire qui dépend donc du ratio Recyclage/dégradation.

Le contrôle de la disponibilité des récepteurs au TGF-ß à la surface des cellules, et par conséquent, la sensibilité des cellules au TGF-ß, se fait également à travers le processus d'élimination de l'ectodomaine (ectodomain shedding). TACE, une métalloprotéase transmembranaire de la famille ADAM, également connue sous le nom d'ADAM17, élimine

par protéolyse l'ectodomaine de TβRI, mais pas de TβRII, en réponse à l'activation de la voie ERK ou p38 MAPK. Cela provoque une diminution de l'expression de TβRI, mais pas de TβRII, à la surface cellulaire atténuant ainsi l'activation de SMAD3 induite par le TGF-β sans affecter la liaison du ligand aux récepteurs TβRII (Liu et al., 2009).

Toujours au niveau des récepteurs, la voie TGF-ß est régulée à travers l'ubiquitination et la dégradation du récepteur TβRI induite par la protéine Smad7 (Ebisawa et al., 2001; Kavsak et al., 2000). La liaison de Smad7 au récepteur TβRI actif bloque son interaction avec les R-SMADs et ainsi leur activation par phosphorylation (Hayashi et al., 1997). D'autre part, TβRI peut aussi subir une sumoylation, ce qui augmente le niveau de recrutement de Smad2 et 3 à ce dernier et ainsi leur activation (Kang et al., 2008).

3. La régulation de l'activité R-SMAD

Dans le cas de sa voie canonique, le niveau et la durée de la signalisation TGF-ß sont directement corrélés à la localisation nucléaire des complexes SMADs actifs et la durée de leur rétention dans le noyau. Toutefois, il a été montré que les SMADs n'ont pas une localisation statique dans le cytoplasme, en l'absence de signalisation, ou dans le noyau lors de la stimulation du TGF- β , mais sont en mouvement dynamique et continu entre ces deux compartiments cellulaires, à la fois en absence et en présence de TGF- β (Inman et al., 2002; Reguly and Wrana, 2003).

L'import nucléaire des SMADs est médié par la protéine d'import nucléaire Importine ß ou par un contact direct entre les domaines C-terminaux (MH2) des Co-SMAD/R-SMADs et les nucléoporines, qui sont des composants du pore nucléaire (Xu et al., 2003). En effet, la caractérisation du domaine MH1 des SMAD3 et SMAD4 a révélé la présence d'une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) permettant leur interaction avec l'Importine ß (Kurisaki et al., 2001; Pierreux et al., 2000; Xiao et al., 2000). L'export de SMAD4, mais pas des R-SMADs, est dépendant de la protéine d'export nucléaire CRM-1 (Chromosome Region Maintenance 1) qui reconnaît la séquence d'export nucléaire NES (Nuclear Export Sequence) de SMAD4 (Pierreux et al., 2000). L'export de SMAD2/3 semble être lié à une interaction directe avec les nucléoporines (Xu et al., 2002). La localisation essentiellement cytoplasmique des SMADs en absence de TGF-ß peut être expliquée par un export nucléaire plus rapide que l'import nucléaire de ces protéines (Schmierer and Hill, 2005). Inversement, les complexes SMAD2/3-SMAD4 subissent une diminution substantielle de leur export nucléaire suite à la phosphorylation des R-SMADs induite par le TGF- β , permettant leur rétention nucléaire (Nicolas et al., 2004).

Ainsi, la phosphorylation des R-SMADs représente une étape clé dans la transduction du signal de la surface de la cellule suite à l'activation des récepteurs de la voie TGF- β , aux promoteurs des gènes cibles au niveau du noyau. Cette phosphorylation est soumise à une régulation faisant intervenir plusieurs protéines de type phosphorylases ou phosphatases. La déphosphorylation des sérines en C-terminal permet de mettre fin à l'action des R-SMADs. Parmi de nombreuses phosphatases examinées, PPM1A/PP2Cα est capable de d'agir sur les deux R-SMADs, Smad2 et Smad3. PPMA1 supprime la phosphorylation ajoutée par le récepteur TBRI au motif SSXS, et favorise le renvoi vers le cytoplasme de Smad2/3 activées par le TGF-ß (Lin et al., 2016). La phosphatase MTMR4 (Myotubularin-related protein 4) peut également déphosphoryler Smad2 et Smad3 entraînant leur séquestration dans les endosomes précoces, et par conséquence une diminution de leur translocation nucléaire (Yu et al., 2010a). Finalement, en condition d'hypoxie, il a été montré que la phosphatase PP2A déphosphoryle Smad3, mais pas Smad2 (Heikkinen et al., 2010). Inversement, la déphosphorylation de Smad2 ou de Smad3 activées par le récepteur TßRI peut être évitée grâce à CLIC4, une protéine multifonctionnelle qui fait la navette entre le cytoplasme et le noyau. La CLIC4 nucléaire s'associe à Smad2 et Smad3 activées et les protège de la déphosphorylation (Shukla et al., 2009).

4. La modulation de la voie TGF-ß par des composés pharmacologiques

L'implication du TGF-ß dans la progression tumorale, à travers ses divers effets prooncogéniques, a fait de lui une excellente cible pour des thérapies anti-cancer. Ces thérapies ont comme objectif d'inhiber la signalisation TGF-ß impliquée dans le développement tumoral, sans affecter son rôle de suppresseur de tumeur. Malgré la difficulté liée à la nature



Figure 6 : Différents types d'inhibiteurs pharmacologiques de la voie TGF-ß. Les quatre principales classes d'inhibiteurs du TGF-ß comprennent les pièges à ligand (par exemple 1D11 ou Fresolimumab), les oligonucléotides antisens (ASO) comme Trabedersen, les inhibiteurs de l'activité kinase du récepteur TßRI tels que LY2109761 ou LY2157299 et les aptamères peptidiques (par exemple Trx-SARA). D'après (Connolly et al., 2012).

pléiotrope de la voie TGF-ß, plusieurs études cliniques ont permis le développement d'une gamme de composés anti-TGF-ß pour le traitement du cancer (Figure 6). Certains de ces inhibiteurs de la voie TGF-ß ont montré des résultats prometteurs dans des études précliniques et cliniques (Neuzillet et al., 2015; Yingling et al., 2004).

Au début, les recherches d'antagonistes de la signalisation du TGF-ß se sont focalisées sur l'inhibition de la liaison du ligand TGF-ß à son récepteur TßRII par compétition en utilisant des protéines capable de piéger le TGF-ß soluble. D'autres recherches ont ensuite généré de nouvelles classes d'inhibiteurs agissant sur les différentes étapes et acteurs de la voie TGF-ß. Les quatre principales classes d'inhibiteurs du TGF-ß comprennent les pièges à ligand (par exemple 1D11 ou Fresolimumab), les oligonucléotides antisens (ASO) comme Trabedersen, les inhibiteurs de l'activité kinase du récepteur TßRI tels que LY2109761 ou LY2157299 et les aptamères peptidiques (par exemple Trx-SARA) (Figure 6) (Zhao and Hoffmann, 2006).

5. La modulation de la voie TGF-ß par d'autres voies de signalisation

La signalisation TGF-ß est impliquée dans la grande majorité des processus cellulaires et est fondamentalement importante de l'embryogenèse jusqu'à l'état adulte chez tous les métazoaires. Le bon fonctionnement de cette voie dépend de sa communication continue et étendue avec d'autres voies de signalisation, conduisant à des effets synergiques ou antagonistes afin d'assurer l'homéostasie au niveau cellulaire et tissulaire. La nature de ces interactions est extrêmement complexe et dépend fortement du contexte (Zhang, 2017; Zhao et al., 2018). Ici nous examinons de façon non exhaustive comment les voies MAPK (mitogen-activated protein kinase), PI3K/AKT (phosphatidylinositol-3 kinase/AKT) et WNT/β-catenine peuvent interférer avec la voie TGF- β.

En plus de leur motif SSXS, les R-SMADs peuvent aussi subir des phosphorylations au niveau de leur région variable "Linker". Cette région est la cible de la kinase ERK (Extracellularsignal-Regulated Kinase), qui phosphoryle SMAD2 et SMAD3 sur des résidus sérines ou thréonines, empêchant leur translocation nucléaire (Kretzschmar et al., 1999). Dans les cellules épithéliales de poumons de mammifère, ces résidus phosphorylés par ERK ont été identifiés et correspondent à la Thr178, la Ser203, et la Ser207 ; leur mutation conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de SMAD3 (Matsuura et al., 2005). De plus, la cascade RAS/ERK induite par TGF-ß, induit à son tour la formation du complexe AP-1, un facteur de transcription, au niveau du promoteur du gène TGF-ß, ce qui augmente la transcription et la sécrétion du ligand TGF-ß (Yue and Mulder, 2000). Inversement, la phosphorylation de la région "Linker" de SMAD2 et SMAD3 par la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) facilite leur activation par TßRI et leur translocation nucléaire (Matsuzaki et al., 2009). Une autre étude a montré que JNK diminue la sécrétion de TGF-ß en agissant sur la boucle d'autorégulation de ce dernier (Ventura et al., 2004). La kinase p38, un autre membre de la famille des kinases MAPK, est capable aussi de phosphoryler SMAD2 et 3 sur les résidus Ser203/207. Cette phosphorylation se fait en coopération avec la kinase ROCK (Rho-dependent kinase) et augmente l'arrêt de prolifération induite par le TGF-ß (Kamaraju and Roberts, 2005). Dans le noyau, p38 phosphoryle aussi les partenaires des SMADs pour augmenter la transcription des gènes cibles du TGF-ß, comme dans le cas de la phosphorylation du facteur de transcription AFT-2 (Activating Transcription Factor-2) (Hanafusa et al., 1999).

Plusieurs études ont prouvé l'implication de la voie PI3K/AKT dans la régulation de la voie TGF-β. Akt affecte directement l'activation des SMADs et leur activité transcriptionnelle à travers, par exemple, son association avec la forme non phosphorylée SMAD3, ce qui limite son activation par TßRI et sa localisation nucléaire (Conery et al., 2004; Remy et al., 2004). Akt peut également réguler la transcription médiée par les SMADs en phosphorylant le facteur de transcription FoxO (Forkhead box O). La coopération entre FOXO et les SMADs est nécessaire pour l'induction des gènes p15INK4B et p21CIP1, impliqués dans l'arrêt de croissance, et sa phosphorylation provoque sa séquestration dans le cytoplasme (Gomis et al., 2006). Enfin, l'activation d'Akt agit également au niveau du récepteur TßRI en phosphorylant et en favorisant la localisation membranaire d'une enzyme de déubiquitination, USP4 (Ubiquitin specific protease 4). La dé-ubiquitination stabilise TßRI permettant l'induction de la signalisation TGF-ß (Zhang et al., 2014).

L'interaction entre la voie WNT/ β -caténine et la voie TGF- β se produit principalement dans le noyau et elle est de type synergique. En effet, la β -caténine forme un complexe avec les SMADs, avec ou sans la protéine LEF (Lymphoid Enhancer-binding), pour induire différents groupes de gènes cibles (Lei et al., 2004). Les R-SMADs forment également des complexes de

transcription avec β -caténine et leur association est stabilisée par le co-activateur p300/CBP (Lei et al., 2004). De plus, ces deux voies régulent réciproquement la production de leurs ligands et influencent ainsi l'induction de leurs voies de signalisation (Liu et al., 2006; Tang et al., 2008).

La voie Hippo a été découverte en 1995 grâce aux cribles génétiques sur la Drosophile visant à isoler des nouveaux gènes impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire (Justice et al., 1995; Xu et al., 1995). Ainsi, le premier composant de la voie identifié fut la protéine Warts dont la fonction est restée inconnue jusqu'à la découverte des autres membres de la voie Hippo à partir de 2002. Sav (Salvador), une protéine de soutien, a été le second composant de la voie à être identifié (Tapon et al., 2002). L'utilisation de cribles génétiques a permis par la suite d'identifier la kinase HPO (Hippo) ainsi que la protéine adaptatrice MATS (Mobs-As-Tumor-Suppressor) (Harvey et al., 2003; Pantalacci et al., 2003; Udan et al., 2003) (Harvey and Tapon, 2007; Lai et al., 2005). Les tissus de drosophile portant des mutations inactivatrices pour HPO et MATS présentent tous une hyper-prolifération et une apoptose réduite, provoquant l'hypertrophie des organes et l'émergence de tumeurs (Figure 7). Ainsi, la voie Hippo a été identifiée à l'origine comme un mécanisme contrôlant la taille des organes chez la drosophile via l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose. Le nom « Hippo » faisant référence aux hippopotames, récapitule bien l'ensemble des phénotypes observés suite à la perte de fonction des composants de cette voie.

La voie Hippo a rapidement attiré l'attention en raison de son rôle remarquable dans la régulation de la taille des organes, ainsi que de sa pertinence apparente pour la régénération des tissus et le cancer. Son étude chez les mammifères a montré que, au cours de l'évolution, la voie Hippo a été très conservée. Tous les composants clés, précédemment découverts chez la Drosophile, possèdent leur homologue dans les cellules de mammifères et jouent un rôle similaire dans le contrôle de la croissance cellulaire normale ainsi que dans la croissance tumorale (Figure 8). En effet, les protéines humaines YAP (Yes-Associated Protein 1), Lats1 (LArge Tumor Suppressor 1), Mst2 (Mammalian Sterile 20-like kinase 2) et Mob1 peuvent sauver fonctionnellement les mutants correspondants chez la Drosophile *in vivo*, suggérant une conservation fonctionnelle de ces gènes (Huang et al., 2005). L'effet de



Figure 7 : Le phénotype mutant pour la voie Hippo dans la drosophile et la souris.

A : Comparaison représentative des phénotypes de drosophiles sauvages (wild type) ou mutées pour le gène Hpo codant la kinase Hippo. B : Comparaison, après 6 mois, entre les foies d'une souris sauvage (wild type) ou mutée pour les gènes codant les kinases Mst1/2 de la voie Hippo. D'après (Johnson and Halder, 2014).

Drosophila	Mammals	Major Functions in Hippo Pathway
Нірро (Нро)	MST1/2	Phosphorylates LATS1/2, MOB1, and SAV1, leading to LATS1/2 activation
Salvador (Sav)	SAV1	Interacts with MST1/2, promotes phosphorylation of LATS1/2 by MST1/2 $% \left(1-\frac{1}{2}\right) =0$
Warts (Wts)	LATS1/2	Phosphorylates and inactivates YAP/TAZ
Mats	MOB1A/B	Scaffold protein of LATS1/2
Yorkie (Yki)	YAP/TAZ	Transcription co-activator, major effector of the Hippo pathway
Scalloped (Sd)	TEAD1-4	Transcription factors that mediate the effect of YAP/TAZ
Tgi	VGLL4	Competes with YAP/TAZ for TEADs, inhibits YAP/TAZ functions
misshapen (Msn)	MAP4K4/6/7	Phosphorylates and activates LATS1/2
Merlin (Mer)	Merlin/NF2	May form a complex and mediates upstream signals (from plasma membrane) to MST1/2; NF2 may bring LATS1/2 to plasma membrane and
Kibra	KIBRA	facilitate its activation by MST1/2
Expanded (Ex)	FRMD6?	
	AMOT	Sequesters YAP/TAZ to cell junctions, binding and indirectly activating LATS1/2; a substrate of LATS1/2

Figure 8 : Les homologues des composants de la voie Hippo chez les mammifères et leur fonctions. D'après (Fa-XingYu et al 2015).

la voie d'Hippo sur la taille des organes initialement observé chez la drosophile est également très conservé chez les mammifères, comme le confirment de nombreuses études chez la souris (Figure 7) (Camargo et al., 2007; Del Re et al., 2013; Zhang et al., 2010).

La plupart des homologues mammifères de la voie Hippo étaient connus bien avant d'être fonctionnellement connectés à la voie Hippo: par exemple, YAP a été isolé en tant que protéine associée à Yes en 1994 (Sudol, 1994), et TAZ, le paralogue de YAP chez les vertébrés, a été isolé en tant que protéine de liaison à la protéine 14-3-3 en 2000 (Kanai et al., 2000). Ce sont toutefois les études génétiques menées chez la drosophile qui ont poussé les chercheurs à considérer l'idée que ces gènes pourraient faire partie d'une même voie de signalisation chez les mammifères. Les études de la voie Hippo chez les mammifères ont révélé une complexité plus importante du fait que certains des composants de la voie possèdent plusieurs homologues chez les mammifères. Les composants ainsi que la signalisation Hippo et sa régulation chez les mammifères seront décrits plus en détails dans la suite de ce manuscrit.

I. La voie de signalisation Hippo chez les mammifères

La voie canonique Hippo chez les mammifères consiste en une cascade de protéines kinases, ayant une activité sérine-kinase, associées à des protéines d'échafaudage (Figure 8). Contrairement aux autres voies de signalisation linéaires, la voie Hippo ne possède pas de ligand et son récepteur contrôlant la cassette kinase, mais une diversité de modules en amont liés aux contacts cellule-cellule, à la contrainte mécanique et aux interactions avec d'autres voies de signalisation. Lorsqu'elles sont activées par des modules en amont, les kinases centrales MST1 et Mst2 phosphorylent directement les kinases en aval Lats1 et Lats2, respectivement au niveau de leurs motifs hydrophobes T1079 et T1041 (Hergovich et al., 2006; Yin et al., 2013).

Les LATS activées interagissent directement avec les protéines YAP et TAZ et les phosphorylent sur des résidus sérine spécifiques: Ser127 et Ser89 respectivement (Lei et al., 2008; Zhang et al., 2008a). Cette phosphorylation génère un site de liaison 14-3-3 menant à



Figure 9 : La voie de signalisation Hippo chez les mammifères. A : la voie Hippo est inactive. Lorsque les kinases MST1/2 et LATS1/2 sont inactives, les protéines YAP/TAZ subissent une translocation nucléaire et jouent le rôle de co-facteur de transcription induisant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la croissance cellulaires ainsi que l'inhibition de l'apoptose. B : la voie Hippo est active. La formation des contacts cellule-cellule ou la stimulation de certains GPCR conduisent à l'activation des kinases MST1/2 puis LATS1/2. Une fois activée, LATS1/2 phosphoryle YAP et TAZ ce qui promeut soit leur interaction avec la protéine 14-3-3 et leur rétention dans le cytoplasme soit leur dégradation par le protéasome. De plus, YAP et TAZ sont retenus, indépendament de leur phosphorylation, au niveau des jonctions intercellulaires et des complexes de polarité. D'après (Ben Mimoun et al., 2018)

la séquestration cytoplasmique de YAP et TAZ (Kanai et al., 2000). D'autre part, la phosphorylation de YAP et TAZ sur Ser381 et Ser311 respectivement conduit à leur dégradation par le protéasome (Figure 8B) (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2010).

En revanche, lorsque les kinases de la voie Hippo ne sont pas actives, YAP et TAZ sont hypophosphorylées et sont transloquées dans le noyau (Figure 8A). YAP et TAZ sont des coactivateurs transcriptionnels favorisant la croissance sans domaine intrinsèque de liaison à l'ADN. Afin de favoriser la prolifération cellulaire, ils se lient aux promoteurs des gènes cibles en interagissant avec des facteurs de transcription se liant à l'ADN, principalement TEAD (Zhang et al., 2008b). Ainsi, la localisation et la phosphorylation de YAP / TAZ sont souvent utilisées pour étudier l'activité de la voie Hippo.

La cascade de protéines kinase est modulée par des protéines d'échafaudage, SAV1 et MOB1, qui agissent toutes deux pour promouvoir la signalisation de la voie Hippo. MOB1 se lie directement à LATS1/2 par l'intermédiaire d'un domaine de liaison à MOB1 (MOB1-Binding Domain) en N-terminal du domaine kinase (Xiong et al., 2017). MOB-1 permet d'activer LATS1 / 2, à la fois *in vitro* et *in vivo*, à travers la phosphorylation de Ser872 et Thr1041 (Hoa et al., 2016). En parallèle, MOB-1, étant elle-même un substrat de MST1 et MST2, fait partie d'une boucle de rétroaction et sa phosphorylation augmente sa capacité à activer LATS1 et LATS2 (Ni et al., 2015). De même, l'activité kinase de MST1 et MST2 est renforcée par leur interaction avec Sav1 en utilisant leur domaine SARAH (Sav / Rassf / Hpo) (Callus et al., 2006).

II. Les substrats de la voie Hippo : YAP et TAZ

YAP et TAZ sont les substrats principaux de la voie Hippo chez les mammifères, et sont les homologues du gène de la drosophile Yorkie (Yki) (Hong and Guan, 2012). Ces deux protéines sont des paralogues et présentent des similitudes au niveau de leur séquence et de leurs domaines fonctionnels (Figure 10).

YAP, une protéine de 65KDa initialement appelée YAP65, est la première protéine identifiée avec un domaine WW, caractéristique de la voie Hippo (Sudol et al., 1995). Le WW domaine



Figure 10 : Structure de YAP et TAZ, leurs domaines fonctionnels et les sites d'interaction avec d'autres protéines. TEAD BD est le site d'interaction avec la protéine TEAD ; 14-3-3 BD est le site d'interaction avec la protéine 14-3-3 après la phosphorylation par LATS1/2. TAD est le domaine d'activation transcriptionnelle. PDZ BD est le domaine qui permet l'interaction avec les protéines ayant un domaine PDZ. D'après (Piccolo et al., 2014)

est un domaine d'interaction protéique contenant deux résidus tryptophanes séparés par une vingtaine d'acides aminés. Des études chez l'humain, ont permis d'identifier 8 isoformes de YAP ayant pour origine un épissage différent au niveau des exons localisés dans le domaine de transactivation de YAP. Certaines de ces isoformes possèdent deux domaines WW. Plus tard, la caractérisation de TAZ a montré la présence dans ce dernier d'un domaine WW. A la différence de YAP, la protéine TAZ n'est pas conservée entre la drosophile et l'humain et semble être spécifique aux vertébrés (Huang et al., 2005).

Il existe une homologie de séquence significative entre TAZ et YAP avec 45% d'identité d'acides aminés entre TAZ humain et YAP humain (Kanai et al., 2000). En outre, la comparaison de l'architecture en domaines de TAZ et YAP a révélé un degré de conservation remarquable. En plus du domaine WW, qui est en position centrale, la partie N-terminale est très conservée entre YAP et TAZ, et contient un domaine de liaison aux protéines de la famille TEF/TEAD et un motif de liaison à la protéine 14-3-3. De plus, YAP/TAZ possèdent chacun un motif de liaison aux domaines PDZ à leur extrémité C-terminale. Ce dernier est essentiel pour leur activité transcriptionnelle et pour leur translocation nucléaire (Kanai et al., 2000; Oka et al., 2010). La même région contient également un motif riche en sérine qui, lorsqu'il est phosphorylé, induit l'ubiquitination de YAP/TAZ et leur dégradation par le protéasome. Chez l'humain, la phosphorylation médiée par LATS1/2 des résidus sérine Ser397 de YAP et Ser311 de TAZ, induit une phosphorylation supplémentaire par les kinases CK1ε/δ, sur les résidus Ser400/403 de YAP et Ser314 de TAZ (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2010) favorisant le recrutement de l'ubiquitine ligase β-TrCP/SCF et la dégradation de YAP et de TAZ.

Il existe cependant plusieurs différences entre TAZ et YAP qui sont susceptibles d'être liées à des fonctions distinctes effectuées par chaque protéine. Par exemple, le domaine de liaison aux protéines TEF/TEAD de YAP n'est pas parfaitement identique à celui de TAZ, ce qui pourrait engendrer des différences dans la fixation des facteurs TEADs (Hau et al., 2013). De plus, YAP contient un motif de liaison SH3 PVKQPPPLAPQSP ainsi qu'une région riche en proline à son extrémité N-terminale, absents dans TAZ. Cette région intervient dans les interactions avec les domaines SH3 de plusieurs protéines, y compris la protéine kinase YES (Sudol, 1994). De plus, dans la région N-terminale de TAZ uniquement, la phosphorylation

par la kinase GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β) sur les résidus Ser58 et Ser62 provoque la dégradation de TAZ suite au recrutement de l'ubiquitine ligase β -TrCP (Huang et al., 2012).

Lorsque l'activité de la voie Hippo est faible ou inhibée, YAP/TAZ sont actifs et exercent leurs fonctions en régulant la transcription des gènes cibles de la voie Hippo. Une fois accumulés dans le noyau des cellules, en tant que co-activateurs transcriptionnels, ces derniers ne peuvent pas se lier directement à l'ADN, et ils doivent impérativement interagir en coopération avec des facteurs de transcription pour moduler l'expression de leurs gènes cibles. Dans les cellules de mammifères, les partenaires transcriptionels les plus importants de YAP et TAZ sont les facteurs de transcription de la famille TEAD (TEAD1-4). Le mutant YAP dans lequel le domaine de liaison à TEAD est délété, a perdu sa capacité à induire la transcription de gènes connus pour être des cibles de YAP (Zhao et al., 2008), et le knockin du YAP déficient pour le domaine de liaison à TEAD (mutant Y94A) imite phénotypiquement le knockout de YAP dans la peau et le cœur (Schlegelmilch et al., 2011; von Gise et al., 2012). Outre TEAD1-4, YAP/TAZ peuvent interagir avec d'autres facteurs de transcription, y compris les SMADs, RUNX1/2, p63/p73, et FoxO, bien que la signification fonctionnelle de ces facteurs de transcription dans la voie Hippo la voie soit moins claire (Ferrigno et al., 2002; Shao et al., 2014; Strano et al., 2001; Zaidi et al., 2004).

Bien que leur rôle en tant que co-activateurs transcriptionnels soit leur rôle essentiel, YAP et TAZ peuvent également réprimer l'expression de certains gènes lorsqu'ils sont liés à des facteurs spécifiques. Par exemple, YAP/TAZ peuvent interagir avec le complexe du remodelage du nucléosome et de la désacétylation des histones NuRD (nucleosome-remodeling and histone desacetylase), ce qui entraîne une répression transcriptionnelle (Kim et al., 2015). YAP a été aussi identifié comme régulateur de la biogenèse des miARNs à travers une interaction directe avec le complexe Dicer (Chaulk et al., 2014).

Malgré le fait que YAP et TAZ soient régulés de la même manière par la voie Hippo et que les deux soient capables de se lier au facteur de transcription TEAD, un nombre croissant d'études suggèrent qu'ils ont des fonctions significativement distinctes. Par exemple, la polykystose rénale est favorisée soit par une localisation nucléaire et une activité transcriptionnelle de YAP, soit par la déplétion de TAZ (Happe et al., 2011; Tian et al., 2007). Il a également été rapporté que TAZ favorise la différenciation myogénique, alors que YAP

l'inhibe (Jeong et al., 2010; Watt et al., 2010). Récemment, l'étude de la redondance fonctionnelle entre YAP et TAZ par Plouffe et al, a montré que l'inactivation de YAP a un effet plus important sur la physiologie cellulaire, notamment l'étalement cellulaire, le volume, la granularité, l'absorption du glucose, la prolifération et la migration, que l'inactivation de TAZ (Plouffe et al., 2018).

III. La régulation de la voie Hippo

Les interactions entre les kinases et les substrats de la voie Hippo ont été bien caractérisées au cours des dernières années. Cependant, les protéines et les évènements cellulaires en amont de la voie Hippo nécessitent encore plus d'investigations. A la différence de la voie TGF-ß, la voie Hippo n'est pas une voie linéaire avec un ligand des récepteurs à la surface de la cellule, mais repose sur l'intégration de signaux, appelés aussi modules, différents en relation avec l'état de la cellule et son environnement. La compréhension de la nature de ces signaux, intra et extra-cellulaires, qui régulent la voie Hippo, et l'identification des mécanismes qui agissent sur les kinases ou sur YAP/TAZ, reste aujourd'hui une question majeure. Ces dernière années, un grand nombre de ces modules a été décrit dans la littérature, parmi lesquels nous retrouvons ceux qui dépendent des contacts cellule-cellule, de l'établissement de la polarité apico-basale, des tension mécaniques ou d'interaction avec d'autres voies de signalisation.

1. Modules dépendants des contacts Cellule-Cellule

a. Les protéines du domaine FERM

Chez la drosophile, les protéines du domaine FERM (4.1 protein, Ezrin, Radixin, Moesin) : Expanded (Ex), Merlin (Mer) et Kibra (KIdney and BRAin protein), forment un complexe protéique au domaine apical des cellules polarisées et activent Wts (Warts, homologue de Lats chez la drosophile) de manière coopérative (Yu et al., 2010b). Kibra contient un domaine C2 qui lui permet d'interagir, à la fois avec les phospholipides à la surface cellulaire, et avec Wts (Genevet et al., 2010). En outre, il a été démontré que Mer et Ex interagissent directement avec Sav et Hpo (Yu et al., 2010b). Toutes ces données suggèrent que le complexe Mer/Ex/Kibra recrute et active les kinases Hippo au niveau de la membrane plasmique. Cependant, une étude plus récente par Ting Su et al. a montré que Merlin et Kibra activent la signalisation Hippo indépendamment d'Expanded et au niveau d'un domaine cellulaire distinct. Les observations microscopiques ont montré que Ex est localisée aux frontières du cortex apical, alors que Mer et Kibra sont localisés au centre du cortex apical. Merlin et Kibra recrutent ensemble la protéine adaptatrice Salvador, qui à son tour recrute la kinase principale Hippo induisant son activation (Su et al., 2017).

Chez les mammifères, de façon similaire à Ex, les membres de la famille des motines (AMOT, AMOTL1, AMOTL2), régulent négativement YAP/TAZ en les séquestrant au niveau apical de la membrane indépendamment de l'activité de la cascade de kinases (Chan et al., 2011; Zhao et al., 2011) (Figure 11). Les protéines AMOTs ne sont pas conservées chez la drosophile, cependant elles possèdent, comme dans le cas de la protéine Ex, un motif PPXY, ce qui pourrait expliquer l'homologie fonctionnelle entre elles. Il a été montré qu'elles régulent également la voie Hippo dans un mécanisme dépendant de l'activation des kinases Lats1/2. En effet, la protéine AMOTL2 forme un complexe avec MST2, LATS2 et YAP au niveau des jonctions serrées, suggérant que AMOTL2 pourrait servir de protéine d'échafaudage facilitant l'activation des kinases de la voie Hippo et ainsi la séquestration cytoplasmique de YAP/TAZ (Paramasivam et al., 2011). De plus, une étude plus récente suggère que la liaison de la protéine AMOT favorise, en libérant le site FERM de NF2 (NeuroFibromin 2), la liaison de ce dernier à Lats1/2 permettant l'activation de la voie Hippo (Li et al., 2015).

La protéine Mer est très conservée chez les mammifères et l'expression du gène Mer humain permet de sauver le phénotype mutant Mer de la drosophile (LaJeunesse et al., 1998). En utilisant des souris knock-out conditionnelles, Zhang et al. ont démontré un lien entre NF2, l'orthologue de mammifère de Merlin, et la voie Hippo. Les résultats de cette étude suggèrent que NF2 et YAP agissent de manière antagoniste pour réguler le développement du foie chez les souris (Zhang et al., 2010). NF2 régule l'activité de la voie Hippo, en interagissant directement avec les kinases MST1/2 et leur recrutement à la membrane plasmique afin d'activer les kinases LATS1/2 (Yin et al., 2013) (Figure 11). D'autres études ont confirmé le rôle de NF2 comme suppresseur de tumeur. Ce régulateur

de l'activité de YAP/TAZ est fréquemment muté dans les cancers chez les mammifères (Harvey et al., 2013). La signification et la pertinence *in vivo* d'Expanded et de Kibra dans la modulation de la voie Hippo chez les mammifères restent à élucider.

b. Les jonctions intercellulaires et les complexes de polarité

Les protéines de jonction cellule-cellule ont été, chez les mammifères, les premiers modules en amont à être caractérisés comme des capteurs de contact par la voie Hippo. Ces jonctions peuvent être divisées en 2 catégories: les jonctions adhérentes et les jonctions de polarité épithéliales. L'établissement de contacts intercellulaires implique les protéines de type cadhérine présentes à la surface de la cellule. La liaison entre les cadhérines de différentes cellules voisines, en créant des complexes intercellulaires cadhérines, augmente avec la densité cellulaire et active la voie Hippo. Cela entraîne la phosphorylation de YAP/TAZ et leur rétention dans le cytoplasme, ce qui inhibe la croissance cellulaire (Hirate et al., 2013; Nishioka et al., 2009). Les jonctions adhérentes régulent l'activité de YAP/TAZ de manière kinase-dépendante ou kinase-indépendante: à travers l'interaction directe avec la kinase MST1/2 (Bhat et al., 2011), ou à travers la séquestration cytoplasmique de YAP/TAZ grâce à leur partenaire commun, l' α -caténine (Schlegelmilch et al., 2011) (Figure 11). In vitro, la déplétion de l' α -caténine induit une accumulation nucléaire de YAP/TAZ. Ce phénotype est également observé in vivo, car l'inhibition de l'expression de l' α -caténine dans l'épiderme augmente l'activité nucléaire de YAP et conduit par conséquent à une hyper-prolifération et à la formation de tumeurs (Schlegelmilch et al., 2011; Silvis et al., 2011).

Les deux complexes de polarité cellulaire apico-basale (le complexe des Crumbs et le complexe aPKC-Par6-Par3), jouent un rôle majeur dans la régulation de la voie Hippo. Le complexe Crumbs est formé par les protéines transmembranaires appelées Crumbs, qui sont codées par 3 gènes (Crb 1 à 3), et les protéines cytoplasmiques PATJ, MUPP1 et PALS1. En plus de ces dernières, d'autres protéines peuvent être recrutées dans le complexe, en fonction du type de cellule et/ou du stade de développement. Chez la drosophile, le court domaine intracellulaire de Crb (Crumbs) contient un motif de liaison FERM qui peut interagir avec la protéine Ex. Cette interaction module la localisation de Ex et sa stabilité, qui à son tour régule l'activité des kinases de la voie Hippo (Figure 11). Lorsque Crb est inhibée, Ex

perd sa localisation apicale entraînant une régulation négative de la voie Hippo et une hyperprolifération (Chen et al., 2010; Ling et al., 2010). Cela a été confirmé dans les cellules de mammifères où la déplétion de la protéine CRB3 ou PALS1 a entraîné une diminution de l'activité de la voie Hippo et l'accumulation nucléaire de YAP/TAZ (Varelas et al., 2010). Contrairement à Ex, l'interaction de Kibra avec le complexe Crumbs a un effet négatif sur l'activité de la voie Hippo (Su et al., 2017). Crumbs présente donc une dualité au niveau de son effet sur la voie Hippo.

2. Modules liés à la tension mécanique

Les cellules sont constamment soumises à différents stimuli mécaniques générés par l'élasticité de la matrice extracellulaire et par les forces de traction des cellules voisines. La capacité d'une cellule de répondre à ces stimuli mécaniques est largement liée à la mise en tension permanente de son cytosquelette *via* des réseaux dynamiques de filaments interconnectés. La prolifération et la différentiation cellulaires font partie de plusieurs évènements cellulaires qui dépendent à la fois de la voie Hippo et des tensions mécaniques que subissent les cellules (Piccolo et al., 2014) (Figure 12). Ainsi, plusieurs études se sont intéressées à la contribution de la mécanotransduction et du cytosquelette cellulaire dans la modulation de l'activité de YAP/TAZ.

Contrairement aux contacts cellule-cellule, l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire stimule la croissance et la prolifération cellulaire. L'adhérence des cellules à la fibronectine active la kinase d'adhérence focale FAK (Focal adhesion kinase) pour inhiber Lats1/2, la kinase principale de la voie Hippo, permettant ainsi à YAP/TAZ d'activer l'expression de leurs gènes cibles (Kim and Gumbiner, 2015). L'effet de l'attachement à la matrice extracellulaire sur l'activation de la voie Hippo dépend de la nature de celle-ci (Figure 12). Lorsque les cellules sont cultivées sur des substrats durs, isolés ou en monocouches confluentes, YAP et TAZ sont principalement nucléaires, ils deviennent de plus en plus cytoplasmiques sur des substrats plus mous (Dupont et al., 2011; Elosegui-Artola et al., 2017; Piccolo et al., 2014).



Figure 11: L'effet des modules dépendants des contacts cellulecellule sur la signalisation Hippo. A cellulaire, densité les protéines des jonctions intercellulaires ainsi que les protéines du complexe Crumbs permettent la séquestration de YAP/TAZ, soit à travers une interaction directe ou en favorisant l'activation de la voie Hippo. Adapté de (Ben Mimoun and Mauviel, 2018).

Figure 12 : Les différents signaux mécaniques liés à la matrice extracellulaires et affectant l'activité de YAP/TAZ. L'effet de l'attachement à la matrice extracellulaire sur l'activation de la voie Hippo dépend de la nature de celle-ci. Lorsque les cellules sont cultivées sur des substrats durs, isolés ou en monocouches confluentes, YAP et TAZ sont principalement nucléaires, ils deviennent de plus en plus cytoplasmiques sur des substrats plus mous. D'après (Piccolo et al., 2014).

Mesenchyma stem cells

La combinaison des contacts cellule-cellule et l'attachement à la matrice extracellulaire ont une influence sur le cytosquelette cellulaire créant de la tension mécanique. La localisation de YAP et TAZ dans un feuillet cellulaire tridimensionnel a démontré que le stress mécanique participe à la modulation de la voie Hippo. Un stress mécanique élevé induit une augmentation de la localisation nucléaire du YAP et du TAZ (Aragona et al., 2013). Toutefois, un stress mécanique pourrait également provoquer l'exclusion nucléaire de YAP et TAZ, dans un processus indépendant de la cascade des kinases Hippo et nécessitant une signalisation impliquant les Rho GTPase et le cytosquelette d'actomyosine (Dupont et al., 2011). De plus, l'étude réalisée par Aragona et al. a montré que la déplétion de LATS1/2 est insuffisante pour renvoyer YAP/TAZ dans les noyaux des cellules cultivées sur des matrices molles ou traitées avec la latrunculine, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (Aragona et al., 2013). Cela suggère que la régulation de la localisation YAP/TAZ par les tensions mécaniques, est non seulement indépendante de la phosphorylation et de l'inhibition de YAP/TAZ induite par les kinases de la voie Hippo, mais domine celle-ci. RhoA est aussi impliquée dans la régulation de la voie Hippo à travers la modulation du cytosquelette d'actine. La formation de filaments d'actine, et par conséquent la génération de tensions cellulaires, entraîne la translocation nucléaire de YAP (Seo and Kim, 2018).

Combiné à la modulation des kinases Hippo par les jonctions intercellulaires ainsi que les complexes de polarité, l'impact direct des tensions mécaniques sur la localisation de YAP et TAZ conduit à une inhibition de contact plus efficace.

3. Les facteurs solubles

Jusqu'à récemment, la littérature suggérait que la voie Hippo était contrôlée essentiellement par l'établissement des contacts cellule-cellule, dans le contexte de cellules polarisées ou non-polarisées, conduisant à une inhibition de la prolifération cellulaire par contact. Cependant, de nouvelles études ont montré que les facteurs extracellulaires solubles jouent également un rôle dans la régulation de la signalisation Hippo. En effet, la voie Hippo est au centre et coordonne les modules à la fois liés à l'inhibition de contact et ceux liés d'autres voies de signalisation comme les ligands des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR, G protein-coupled receptors) et les facteurs de croissance.

Les GPCR sont une grande classe de récepteurs qui se lient aux protéines G et répondent à une variété de ligands. L'effet sur la voie d'Hippo dépend du type de ligand du type de récepteur activé et du type de protéine G couplée à ce dernier (Figure 13). Par exemple, l'acide lysophosphatidique (LPA) et la sphingosine 1-phosphate (S1P) qui activent des GPCRs couplés aux protéines G12/G13 inhibent Lats1/2 et activent ainsi YAP. Au contraire, l'épinéphrine et le glucagon qui stimulent des GPCRs couplés à Gs activent Lats1/2 et inhibent YAP et TAZ (Yu et al., 2012). Les récepteurs GPCRs peuvent également affecter directement Lats1/2, sans passer par l'activation de MST1/2, de façon dépendante des Rho GTPases pour ceux couplés à G12/13 et Gq /11, et de la protéine kinase A (PKA) pour ceux couplés à Gs (Yu et al., 2013).. Les protéines Wnt, telles que Wnt5a/b, interfèrent également avec la signalisation d'Hippo. Les ligands non-canoniques de Wnt, Wnt5a/b, activent YAP/TAZ *via* l'axe de signalisation G α 12/13-Rho-LATS en se liant au récepteur GPCR Frizzled (Park et al., 2015).

Dans la plupart des cas, ces facteurs de croissance solubles inhibent la signalisation Hippo et bloquent l'impact des contacts cellule-cellule comme dans le cas de la signalisation insuline/IGF (Strassburger et al., 2012), des GPCRs (Yu et al., 2012), et la signalisation EGF (Fan et al., 2013; He et al., 2015). La capacité de la voie Hippo à coordonner l'inhibition de contact et la signalisation mitogénique est essentielle pour son rôle au cours du développement de l'embryon et de la cicatrisation dans les tissus adultes (Figure 14).

En plus de la voie des GPCRs, la voie Wnt et la voie EGF, la voie Hippo interagit avec les cascades de signalisation déclenchées par d'autres facteurs de croissance tels que Hedgehog, Notch et la voie TGF-ß (Yu et al., 2015). Compte tenu de leur rôle commun dans le contrôle de la croissance cellulaire, l'interaction entre les voies TGF-ß et Hippo est examinée en détails dans la suite de ce manuscrit.



Figure 13 : la régulation de la kinase LATS par les différents GPCRs. L'effet de la signalisation des GPCRs sur la voie d'Hippo dépend du type de ligand du type de récepteur activé et du type de protéine G couplée à ce dernier : l'acide lysophosphatidique (LPA) et la sphingosine 1phosphate (S1P) qui activent des GPCRs couplés aux protéines G12/G13 inhibent Lats1/2 et activent ainsi YAP. Au contraire, l'épinéphrine et le glucagon qui stimulent des GPCRs couplés à Gs activent Lats1/2 et inhibent YAP et TAZ. Adapté de (Yu et al., 2012).



Figure 14 : Antagonisme entre l'inhibition de contact et la signalisation mitogénique et son impact sur la régulation de la voie Hippo. La voie Hippo est sous le contrôle de deux modules antagonistes : les contacts cellule-cellule qui induisent l'inhibition de contact à travers l'activation de la voie Hippo, et la signalisation mitogénique qui inhibe la voie Hippo afin d'induire la proliferation et la croissance cellulaire. Ainsi, la voie Hippo joue un rôle important dans l'intégration de ces signaux contradictoires au cours du développement de l'embryon et de la cicatrisation dans les tissus adultes. D'après (Barry et al., 2014)

IV. L'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo

La majorité de la réponse cytostatique à la stimulation par le TGF- β peut être attribuée à l'activation de la voie canonique du TGF- β qui dépend de l'interaction entre les différentes protéines SMADs : les R- SMADs, les Co- SMADs et les I-SMADs. De ce fait, plusieurs études se sont intéressées à l'étude de l'interaction entre les substrats de la voie Hippo YAP/TAZ et les protéines SMADs.

Une interaction directe entre YAP et SMAD7 a été identifiée dans la lignée cellulaire de mammifères COS-7 (Ferrigno et al., 2002). Cette association protéine-protéine implique plusieurs domaines de SMAD7, dont le motif PY, et potentialise l'activité inhibitrice de SMAD7 contre la voie canonique du TGF- ß. En effet, lorsque la voie Hippo est activée, la liaison de SMAD7 à YAP cytoplasmique augmente son affinité pour le récepteur TGF-ß de type I, empêchant ainsi la phosphorylation des R-SMADs. En outre, SMAD7 favorise également l'association des ligases d'ubiquitine E3, Smurf1 et Smurf2, avec le TGF-ß RI activé, ce qui conduit à sa dégradation par le protéasome. Cette interaction entre YAP et Smad7 a été le premier pas dans l'élucidation de l'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo. La régulation négative de la voie TGF-ß par la voie Hippo à travers la protéine SMAD7 a été confirmée dans une étude récente réalisée dans des fibroblastes humains. Cette fois, l'interaction entre YAP/TAZ et SMAD7 est indirecte. La diminution simultanée du niveau d'expression de YAP et de TAZ, et non pas d'un des deux, induit l'activation du facteur de transcription AP-1 qui induit à son tour l'expression de SMAD7 (Qin et al., 2018).

Aucune Interaction n'a été mise en évidence entre YAP/TAZ et SMAD4. En outre, plusieurs études ont montré que Smad4 n'est pas requis pour la translocation nucléaire de Smad2/3 phosphorylée et dans l'activation de certains gènes cibles de la voie TGF-ß (Jazag et al., 2005; Levy and Hill, 2005; Vindevoghel et al., 1998). Ceci suggère que Smad4 ne serait pas essentiel pour l'interaction entre la voie Hippo YAP/TAZ et Smad2/3. Ceci a été confirmé par une étude utilisant des cellules HaCat traitées avec des petits ARN interférents ciblant Smad4, et montrant que l'absence de Smad4 n'empêche pas l'interaction YAP/TAZ Smad2/3 dans le noyau et dans le cytoplasme (Grannas et al., 2015). Il est important de noter que les cellules HaCat (Kératinocytes humains immortalisés) n'établissent pas une polarité apico-basale

quand elles sont cultivées à forte densité cellulaire et que cette étude n'a pas élucidé la conséquence fonctionnelle de l'interaction entre YAP/TAZ et SMAD2/3.

Plusieurs études ont aussi tenté d'examiner l'interaction entre YAP/TAZ et les R-SMAD (SMAD2 et SMAD3). L'interaction entre YAP et SMAD3 a été d'abord détectée par le groupe de Massagué dans des expériences d'immunoprécipitation de protéines surexprimées (Alarcon et al., 2009). Cela a été confirmé plus tard par une autre étude utilisant elle aussi des protéines surexprimées (Fujii et al., 2012). Cependant, il est très important de noter que dans ces deux études l'interaction démontrée entre YAP et SMAD3 est une interaction de faible affinité si on la compare par exemple à celle entre YAP et SMAD1 (Alarcon et al., 2009; Fujii et al., 2012). Plus récemment, l'étude réalisée par Varelas et al. suggère que l'interaction des SMADs avec TAZ est requise pour leur translocation nucléaire et leur activité transcriptionnelle en réponse au TGF-ß (Varelas et al., 2008) (Figure 15). En effet, les résultats montrent que, dans les cellules HepG2 (cellules de carcinome du foie humain) et des cellules hESCs (cellules souches embryonnaires), l'inhibition de TAZ provoque une perte de la translocation nucléaire de SMAD2 suite à l'induction au TGF-ß. Cependant, cette étude n'a pas examiné l'interaction entre YAP et SMAD2/3 et n'a donné aucune précision sur l'état de polarisation des cellules épithéliales utilisées.

En outre, la voie TGF-ß module négativement la voie Hippo en interagissant avec la protéine d'échafaudage RASSF1A. En réponse au TGF-ß, RASSF1A est recruté au récepteur du TGF-ß de type I, pour subir une ubiquitination puis une dégradation dans le protéasome. Ceci empêche l'activation de la cascade des kinases MST1/LATS et facilite la translocation nucléaire YAP/SMAD2 (Pefani et al., 2016).



Figure 15 : Le modèle d'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo, proposé par Varelas et al. : YAP/TAZ bloque la translocation nucléaire des SMAD2/3 activés. A forte densité cellulaire, l'établissement des jonctions intercellulaires et la formation des complexes Crumbs induisent la séquestration cytoplasmique de YAP/TAZ, soit directe ou à travers la protéine 14-3-3 suite à leur phosphorylation par la voie Hippo. YAP/TAZ cytoplasmiques séquestrent à leur tour les complexes SMAD2/3-SMAD4 formés suite à la phosphorylation de SMAD2/3 par les récepteurs du TGFß au niveau apical ou basolatéral de la membrane. Ainsi, YAP/TAZ empêchent la translocation nucléaire des protéines SMADs qui est nécessaire pour l'expression des gènes cibles de la voie TGF-ß. Adapté de (Ben Mimoun and Mauviel, 2018).

Chapitre 3 : La polarité apico basale des cellules épithéliales

I. La structure épithéliale

L'épithélium, une caractéristique fondamentale des métazoaires, est le premier tissu à se développer au cours de la phylogenèse et de l'ontogenèse (Bryant and Mostov, 2008). L'aspect évolutif de l'épithélium reflète l'exigence des métazoaires pour une structure tissulaire qui peut séparer leur milieu interne de l'environnement extérieur. Actuellement, chez les mammifères, il existe plus de 150 types différents d'épithéliums qui forment les composants fonctionnels clés de la plupart des organes du corps (Rodriguez-Boulan and Macara, 2014).

C'est l'adhérence étroite des cellules épithéliales les unes aux autres le long de la membrane basale à travers plusieurs types de contacts qui aboutit à la formation du tissu épithélial. Le tissu épithélial ou épithélium se présente sous deux formes : l'épithélium glandulaire et l'épithélium de revêtement. L'épithélium de revêtement recouvre ou tapisse toutes les surfaces libres de l'organisme et contient des cellules polyvalentes, tandis que l'épithélium glandulaire constitue la portion sécrétrice des glandes.

Les épithéliums sont composés presque entièrement de cellules. Ces cellules sont séparées par une quantité minimale de matériel extracellulaire, principalement des projections de leurs protéines membranaires intégrales dans les espaces étroits entre les cellules. Ils peuvent donc être classés selon la forme de leurs cellules et le nombre de couches de cellules qui les forment. Il existe trois formes principales de cellules épithéliales: pavimenteuses, cubiques et prismatiques. Celles-ci peuvent être disposées en une seule couche de cellules sous forme d'épithélium simple ou en plusieurs couches, sous forme d'épithélium stratifié (Figure 16). L'épithélium pseudo-stratifié est souvent considéré comme une classe à part. En effet, ce dernier est formé par une seule couche de cellules



Figures 16 : Classification des épithéliums selon la forme (A) et le nombre de couches de cellules (B). Les épithéliums peuvent être classés selon la forme de leurs cellules et le nombre de couches des cellules qui les forment. Il existe trois formes principales de cellules épithéliales: pavimenteuses, cubiques et prismatiques. Celles-ci peuvent être disposées en une seule couche (épithélium simple) ou en plusieurs couches (épithélium stratifié). D'après (Pearson Education 2003).

prismatiques, qui toutes reposent sur la membrane basale. Cependant, il a une caractéristique qui le distingue de l'épithélium simple: ses cellules ont une hauteur variable ce qui donne l'impression qu'il est composé de plusieurs couches.

Simples ou stratifiés, tous les épithéliums comprennent une seule couche de cellules capables de division cellulaire dont le domaine basal est attaché à la membrane basale sousjacente. La membrane basale, couche mince non cellulaire, se situe entre l'épithélium et le tissu conjonctif. Cette membrane a une épaisseur d'environ 50 nanomètres et est constituée de glycoprotéines collagéniques ou non collagéniques et de protéoglycanes (Paulsson, 1992). Elle fournit un support structural pour l'épithélium et sert de barrière sélective pour le mouvement des matériaux vers et à partir du tissu de soutien. A la différence des autres tissus, les épithéliums ne contiennent pas de vaisseaux sanguins. Leurs cellules doivent donc être nourries par diffusion de nutriments à partir du tissu conjonctif sous-jacent, à travers la membrane basale. Ainsi, tous les épithéliums sont soutenus par une couche sous-jacente de tissu conjonctif. Alors qu'ils ne sont pas vascularisés, les épithéliums peuvent contenir des terminaison nerveuses, nécessaires pour certaines de leurs fonctions telles que la perception sensorielle de l'épithélium olfactif.

Les fonctions des cellules épithéliales comprennent la sécrétion, l'absorption sélective, la protection contre les pathogènes, le transport trans-cellulaire et la perception sensorielle. La majorité de ces fonctions est assurée grâce à l'acquisition des cellules épithéliales de la polarité apico-basale qui permet de créer des domaines cellulaires spécialisés.

Le tissu épithélial a une grande capacité de régénération. Certains épithéliums sont exposés à la friction, et leurs cellules superficielles se détachent. D'autres sont détruits par des substances hostiles issues de l'environnement externe telles que les bactéries, les acides et la fumée. Dans les conditions physiologiques normales, les cellules épithéliales peuvent rapidement se diviser afin de remplacer les cellules endommagées (Blanpain and Fuchs, 2014).

1. L'établissement des jonctions intercellulaires

L'établissement d'un épithélium nécessite l'établissement de jonctions intercellulaires entre les cellules voisines. Cela est possible grâce à plusieurs complexes protéiques, distincts au niveau moléculaire et morphologique, comprenant les jonctions adhérentes, les jonctions GAP, les jonctions serrées et les desmosomes (Figure 17). Chaque type de jonction intercellulaire a sa composition protéique unique, joue différents rôles fonctionnels et est essentiel pour le maintien de l'intégrité cellulaire et fonctionnelle de l'épithélium.

Les jonctions adhérentes sont disposées selon une configuration en forme de ceinture autour des cellules épithéliales adjacentes et sont connectées de manière intracellulaire à des filaments d'actine. Les jonctions adhérentes sont composées de deux familles de protéines transmembranaires: les cadhérines et les nectines. Les cadhérines, une classe de glycoprotéines qui s'expriment à la surface cellulaire, forment des interactions homophiles (entre molécules identiques) entre des protéines de deux cellules voisines. L'interaction entre ces dernières est dépendante des ions calcium (Ca^{2+}), d'où leur nom (Kim et al., 2011). Sur la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire, les cadhérines sont liées aux filaments d'actine par les protéines α -caténines et β -caténines. La mutation ou la régulation négative des E-cadhérines, un membre de la superfamille des cadhérines, est un événement clé de la transition épithélio-mésenchymateuse lors de la progression tumorale (Rosso et al., 2017). Dans certaines tumeurs invasives comme le cancer de la prostate, la E-cadhérine est remplacée par d'autres types de cadhérines, telle que la N-cadhérine (Gravdal et al., 2007). La partie cytoplasmique des cadhérines leur permet de se lier au cytosquelette d'actine grâce à des protéines adaptatrices telles que les catenines α et β (Campbell et al., 2017). Comme pour les cadhérines, les nectines d'une cellule forment des dimères avec les nectines de la cellule voisine. Cependant, les dimères de nectines sont incapables de supporter une forte adhérence cellule-cellule comme dans le cas des cadhérines, et l'afadine est la protéine adaptatrice pour la liaison entre les nectines et le réseau d'actine.

Comme pour les jonctions adhérentes, les desmosomes fournissent une stabilité mécanique entre les cellules permettant le maintien de l'intégrité tissulaire. Les desmosomes sont le type le plus commun de jonction intercellulaire dans les cellules épithéliales des vertébrés. Ils contiennent aussi de la cadhérine sous forme de desmogléine (Dsg1-4) et de la



Figure 17 : La structure épithéliale d'un épithélium simple. Un tissu épithélial consiste en un ensemble de cellules épithéliales qui adhèrent étroitement d'une part à la membrane basaleet d'autre part, les unes aux autres grâce à plusieurs types de jonctions intercellulaires établies au niveau du domaine latéral de la membrane cytoplasmique des cellules adjacentes. Le tissu épithélial peut contenir des terminaisons nerveuses mais il n'est pas vascularisé. C'est le tissu conjonctif qui permet d'apporter les nutriments et l'oxygène aux cellules épithéliales. D'après Pearson Education 2003).

desmocolline (Dsc1-3) liées cette à la plakoglobine, elle même liée à la desmoplakine qui fixe les filaments intermédiaires. Ces derniers forment une charpente structurale pour le cytoplasme et assurent sa résistance aux forces latérales.

Finalement, les **jonctions serrées** sont un type particulier de jonctions intercellulaires qui participe à la fois à l'adhérence entre les cellules épithéliales, et à leur acquisition d'une polarité apico-basale. En effet, elles jouent deux rôles essentiels lors de l'établissement de la polarité apico-basale : un rôle de barrière contre le passage des molécules à travers l'épithélium, et un rôle de clôture permettant le maintien d'une composition hétérogène entre le domaine apical et le domaine basolatéral de la membrane cytoplasmique. Pour cela nous nous intéresserons particulièrement à ces jonctions, dont la composition et le rôle seront traités plus en détails dans la suite de ce manuscrit (Chapitre 3, section II).

Toutes ces jonctions intercellulaires, sont importantes et jouent un rôle précis dans l'établissement d'un tissu épithélial. En effet, l'assemblage des jonctions cellulaires est un processus à multi-étapes et bien ordonné. Tout d'abord, les membranes des cellules voisines étendent des protrusions riches en actine, plaçant deux membranes cellulaires opposées à proximité étroite. Deuxièmement, les nectines sur une cellule forment des interactions homophiles avec les nectines sur les cellules adjacentes. Ensuite, les protéines des jonctions adhérentes, les cadhérines, se dimérisent à travers l'espace paracellulaire et établissent les premiers contacts adhésifs cellule-cellule. Cette étape est primordiale pour permettre enfin la formation des jonctions serrées (Campbell et al., 2017).

En plus de ces deux complexes adhésifs, les jonctions communicantes appelées aussi jonctions GAP forment des canaux entre les cellules adjacentes et fournissent un moyen de communication intercellulaire dans les épithéliums (Giepmans, 2004). Ils permettent le passage de petites molécules (PM<2KDa) telles que le calcium (Ca²⁺⁾, le potassium (K⁺), les messagers secondaires AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) et les produits métaboliques (acides aminés). Les jonctions GAP sont formées par des protéines membranaires appelées connexines. Ces dernières jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et sont fréquemment dérégulées au cours du développement tumoral (Phillips et al., 2017).

2. L'établissement de la polarité apico-basale

La polarité cellulaire dicte la distribution spatiale asymétrique de complexes moléculaires et de structures cellulaires permettant de déterminer la forme et la fonction de la cellule. De l'embryogenèse à l'état adulte, plusieurs types de cellules deviennent polarisés de façon transitoire ou permanente. Ainsi, Il n'y a pas un seul type de polarité mais plusieurs, incluant la polarité apico-basale des cellules épithéliales, la formation de cellules asymétriques dans le développement embryonnaire précoce, la polarité des neurones et la migration cellulaire polarisée. Les cellules épithéliales sont uniques parmi les types de cellules polarisées car leur polarité dépend strictement de l'intégration de la cellule dans un contexte cellulaire plus large, l'épithélium.

L'intégration d'une cellule dans un épithélium est majoritairement associée, sauf dans le cas des kératinocytes, à une transition d'un état non polarisé à un état polarisé. Ce processus de polarisation dans des cellules telles que les cellules EpH4, MDCK ou MCF10A implique l'établissement d'un type spécialisé de jonctions intercellulaires appelées « Jonctions Serrées » ou « Tight Junctions » (TJs) accompagné de la formation de trois complexes de polarité: le complexe des Crumbs, le complexe aPKC-Par6-Par3 et le complexe Scrible. En conséquence, la membrane cytoplasmique des cellules polarisées est divisée en deux domaines, l'un apical et l'autre basolatéral, avec une composition hétérogène en lipides et en protéines. Cette compartimentation permet aux cellules épithéliales d'effectuer de multiples fonctions clés et nécessaires à l'homéostasie de l'organisme, comme son rôle de barrière physiologique, le transport des nutriments du milieu externe vers le milieu interne et *vice-versa*, et l'élimination des déchets vers les espaces extérieurs.

La polarité apico-basale permet de créer des domaines cellulaires spécialisés. Les surfaces apicales des cellules épithéliales comportent souvent trois spécialisations de surface:

- Les microvilli qui sont de petites extensions de la membrane projetées à la surface apicale de la majorité des cellules épithéliales, permettant d'augmenter considérablement la surface apicale. On les trouve notamment au niveau de la bordure de la brosse intestinale et dans le tubule contourné proximal des reins. les stéréocils qui sont des microvillosités inhabituellement longues et non mobiles qui se trouvent à la surface de l'épithélium de l'épididyme et du canal déférent de l'appareil reproducteur masculins.

 les cils vibratiles qui sont des processus activement mobiles avec une structure interne complexe qui se trouve sur la muqueuse épithéliale des voies respiratoires et de l'appareil reproducteur féminin.

a. Les protéines impliquées dans l'établissement de la polarité apico-basale

Trois complexes de polarité majeurs participent à l'établissement de la polarité apicalebasale (Figure 18): le complexe Crumbs (CRB) est nécessaire pour définir le domaine apical de la membrane et est formé de la protéine transmembranaire CRB et des protéines cytoplasmiques associées PALS1, PALS1 et PATJ (Margolis, 2018); le complexe PAR favorise l'établissement de la bordure latérale du domaine apical et comprend PAR3, PAR6, la protéine kinase C atypique (aPKC, PKCζ et PKCι chez les humains) et la protéine du contrôle de la division cellulaire CDC42; le complexe Scribble, composé des protéines Scribble (SCRIB), Lethal giant larvae (LgI) et Discs large (Dlg) et qui définit le domaine basolatéral de la membrane plasmique (Su et al., 2012). Ces trois complexes ont des interactions antagonistes et régulent spatio-temporellement l'établissement de la polarité apico-basale par leurs interactions avec le cytosquelette et les protéines d'adhérence. Ces complexes de polarité sont hautement conservés chez les mammifères (Khursheed and Bashyam, 2014).

Aux stades précoces de la polarisation cellulaire, PAR3 se lie à l'afadine au niveau des contacts primordiaux formés de jonctions adhérentes et de protéines JAMs (Figure 18). La maturation des jonctions cellulaires primordiales, nécessite l'exclusion de PAR3, et donne naissance aux jonctions d'adhérence et aux jonctions serrées. Lors de l'étape finale de l'établissement de la polarité, PAR3 est exclut à la fois des complexes PAR6-aPKC et CRB afin de s'associer aux jonctions serrées. En parallèle, le complexe SCRIB, localisé dans le domaine baso-latéral, antagonise les complexes PAR et CRB, ce qui restreint leur activité et donc l'expansion du domaine apical (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2011).



Figure 18 : Les étapes de l'établissement de la polarité apico-basale. Aux stades précoces de la polarisation cellulaire, PAR3 se lie à l'afadine au niveau des contacts primordiaux formés de jonctions adhérentes et de protéines JAMs. La maturation des jonctions cellulaires primordiales, nécessite l'exclusion de PAR3 et donne naissance aux jonctions d'adhérence et aux jonctions serrées. Lors de l'étape finale de l'établissement de la polarité, PAR3 est exclu à la fois des complexes PAR6-aPKC et CRB et s'associeaux jonctions serrées. En parallèle, le complexe SCRIB, localisé dans le domaine baso-latéral, antagonise les complexes PAR et CRB, ce qui restreint leur activité et donc l'expansion du domaine apical. D'après (Martin-Belmonte and Perez-Moreno, 2011)
L'établissement de la polarité implique, non seulement les complexes de polarité, mais aussi les jonctions adhérentes ainsi que les jonctions serrées. L'importance de chacune de ces jonctions sera traitée dans la suite de ce manuscrit.

b. Le rôle de l'adhérence cellulaire dans l 'établissement et le maintien de la polarité

Le maintien de l'adhérence cellulaire est un pré-requis pour le maintien de la polarité apicobasale (Knust, 2002). *In vitro*, la déplétion en calcium extracellulaire est utilisée comme outil pour détruire l'adhérence cellulaire et, par conséquence, la polarité apico-basale. Certes, bien que les contacts entre les cellules épithéliales soient composés à la fois de jonctions calcium-dépendantes et d'autres indépendantes du calcium, il a été montré qu'aucun type de jonctions ne peut être maintenu lorsque les cellules sont incubées dans un milieu contenant moins de 10 µM de calcium extracellulaire (Gonzalez-Mariscal et al., 1990). Cette perte de jonctions intercellulaires induit des changements de forme cellulaire ainsi qu'une perte de l'organisation en domaines des cellules et de l'étanchéité du tissu épithélial (Brown and Davis, 2002; Giepmans and van Ijzendoorn, 2009; Kim et al., 2011).

Une étude plus récente suggère que les jonctions adhérentes influencent la formation des jonctions serrées par des changements dans la composition lipidique de la membrane (Shigetomi et al., 2018). Les résultats montrent que la perte des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales EpH4 délétées pour l' α -caténine, provoque une altération du taux de cholesterol dans la membrane plasmique et conduit à l'endocytose des claudines, un composant majeur des TJs.

c. Le renouvèlement de l'épithélium et la polarité apico-basale

Au sein des épithéliums, les cellules subissent des changements de forme cellulaires assez spectaculaires sans pour autant abolir la polarité apico-basale ou l'adhérence cellulaire. Plusieurs évènements peuvent induire ces changements, comme les mouvements des cellules dans des épithéliums intacts et la division cellulaire par mitose des cellules épithéliales. Dans le cas de la mitose, le maintien d'une localisation normale sur l'axe apicobasal a été confirmé pour plusieurs types de protéines telles que la Desmoplakine, ZO-1 et la Vinculine dans les cellules MDCK et dans la peau des mammifères (Baker and Garrod, 1993; Devenport et al., 2011), ainsi que la E-cadhérine, Crumbs et Notch chez la drosophile (Founounou et al., 2013). Il existe donc une coordination entre la mitose d'un coté et les jonctions cellulaires et les complexes de polarité de l'autre, afin de maintenir la polarité apico-basale lors du renouvellement de l'épithélium. Bien que les facteurs moléculaires et les mécanismes qui contrôlent la cytokinèse aient été identifiés dans le cas de cellules isolées, on connaît peu de choses sur la façon dont l'intégrité des tissus est maintenue lorsqu'une cellule épithéliale se divise au sein d'un épithélium.

Les dernières études de la mitose dans les cellules épithéliales proposent un modèle dans lequel les cellules se divisent avec le fuseau mitotique orienté parallèlement à membrane basale (Figure 19). Les jonctions adhérentes sont décrites comme un acteur majeur dans la formation de l'anneau de séparation lors de l'étape de cytocinèse (Le Bras and Le Borgne, 2014). Cela donne naissance à deux cellules filles, toutes deux intégrées dans l'épithélium recevant chacune un côté apical et un côté basal.



Figure 19 : Maintien de la polarité apico-basale lors de la mitose. Lors de la mitose, les cellules épithéliales se divisent avec le fuseau mitotique orienté parallèlement à membrane basale. Le maintien lors de l'étape de cytocinèse des jonctions adhérentes et des jonctions serrées permet de donner naissance à deux cellules filles, toutes deux intégrées dans l'épithélium recevant chacune un côté apical et un côté basal. D'après (Le Bras and Le Borgne, 2014)

II. Les jonctions serrées – acteur majeur de la polarité apicobasale

1. Découverte des jonctions serrées

Les jonctions serrées (TJs), ou zonula occludens, nommées par Farquhar et Palade en 1963, sont les jonctions intercellulaires les plus apicales et apparaissent comme une structure en forme de ceinture continue par microscopie électronique classique (Farquhar and Palade, 1963). La microscopie électronique par congélation-fracture, une technique qui permet d'observer la partie intérieure hydrophobe d'une membrane, a révélé que les TJs sont un réseau continu de brins intra-membranaires entourant la surface apicale des cellules épithéliales (Figures 20, 21) (Furuse, 2010; Staehelin, 1973).

L'observation par microscopie électronique des jonctions serrées a soulevé des questions sur leur architecture moléculaire. Deux modèles ont ainsi émergé: un modèle lipidique et un modèle protéique. Les jonctions serrées ont d'abord été décrites comme des fusions des feuillets lipidiques externes des bicouches membranaires adjacentes de cellules voisines. La découverte d'un nombre croissant de protéines transmembranaires a éliminé le modèle original basé sur les lipides, en faveur d'un modèle basé sur des interactions protéiques (Lee et al., 2008). En effet, l'identification de la composition moléculaire des TJs au cours des deux dernières décennies a révélé que les TJs sont des complexes multi-protéiques dynamiques avec des composants transmembranaires et d'autres cytoplasmiques faisant le lien avec le cytosquelette cellulaire.

Cependant, les lipides sont aussi importants pour les jonctions serrées et leurs fonctions. Par exemple, il a été démontré que certaines protéines de jonctions serrées sont associées à des micro-domaines membranaires riches en cholestérol et résistants aux détergents, et que la réduction de la teneur en cholestérol membranaire peut modifier les propriétés de la barrière épithéliale (Lambert et al., 2005; Lynch et al., 2007). De plus, une autre étude a montré que l'altération du taux de cholesterol dans la membrane plasmique conduit à l'endocytose des claudines, un composant majeur des TJs (Shigetomi et al., 2018).



Figure 20 : La morphologie des jonctions serrées. A : Observation par microscopie électronique d'une section illustrant les contacts entre les TJs situées dans les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes (Barre=100 nm). B : Observation par la technique de microscopie électronique congélation-fracture de l'aspect de brins continus autour des cellules épithéliales (Barre= 200 nm). D'après (Furuse, 2010).



Figure 21 : Schéma du réseau de jonctions serrées au niveau du domaine apical des cellules épithéliales polarisées. Les jonctions serrées sont organisées sous la forme d'un réseau continu de brins intra-membranaires entourant la surface apicale des cellules épithéliales et permettant de souder ensemble les membranes des cellules avoisinantes. D'après (OpenStax Biology)

2. Composition moléculaire des jonctions serrées

Les jonctions serrées se forment suite à des interactions homophiles (entre molécules identiques) et hétérophiles (entre molécules différentes, comme par exemple les protéines de la famille de Claudines) qui impliquent plusieurs protéines d'adhérence. Ces protéines peuvent être séparées en deux groupes : les protéines transmembranaires (Figure 22) et les protéines cytoplasmiques.

Parmi les protéines transmembranaires on trouve les claudines (du latin : claudere, fermer) possédant un poids de 22 KDa et constituées d'une chaine polypeptidique qui traverse quatre fois la membrane, dont les extrémités N-terminales et le C-terminales sont cytoplasmiques (Figure 22). Les domaines extracellulaires sont disposés en deux grandes boucles extracellulaires : la première boucle contient plusieurs résidus d'acides aminés chargés qui régulent la sélectivité de la charge paracellulaire (Colegio et al., 2002), la deuxième boucle est impliquée dans la dimérisation des claudines entre les cellules adjacentes, aidant à sceller la jonction et à réguler le transport paracellulaire (Piontek et al., 2008). Le domaine C-terminal cytoplasmique contient un motif PDZ permettant le recrutement des protéines d'échafaudage telles que ZO-1/2/3 (Itoh et al., 1999). Claudine fait partie d'une famille de 20 membres, dont plusieurs peuvent être présents dans une même jonction. Les différentes compositions possibles des claudines pourraient expliquer la différence de perméabilité des jonctions serrées observée d'un tissu à un autre (Luettig et al., 2015; Schlingmann et al., 2016).

Les Occludines, protéines de 64 KDa, ont une organisation similaire à celles des Claudines au niveau des jonctions serrées. Elles sont constituées également d'une chaine polypeptidique qui traverse quatre fois la membrane cytoplasmique, avec les deux extrémités N-terminale et C-terminale situées dans le cytoplasme (Figure 22). La première boucle extracellulaire est impliquée dans les interactions des Occludines entre les cellules adjacentes, tandis que la seconde boucle extracellulaire est nécessaire pour la localisation de l'occludine aux jonctions serrées (Medina et al., 2000). Comme Claudine, le domaine C-terminal d'Occludine contient un motif PDZ de liaison aux protéines d'échafaudage (Balda et al., 1996). Cependant, à la différence des Claudines, ces dernières ne sont pas essentielles pour la formation des jonctions serrées (Schulzke et al., 2005).

La troisième protéine transmembranaire est la JAM (Junctional Adhesion Molecule). Cette dernière possède un poids moléculaire de 33KDa et sa chaine polypeptidique traverse la membrane une seule fois (Figure 22). Le domaine cytoplasmique est impliqué dans des interactions avec des protéines d'échafaudage et du complexe de polarité (Ebnet et al., 2003). Le domaine extracellulaire est impliqué dans les interactions homophiles entre les JAMs des cellules adjacentes pour stabiliser les jonctions serrées. En effet, les JAMs se localisent au niveau des jonctions serrées et soutiennent leur formation et leur fonction de barrière (Liu et al., 2000).

Les protéines transmembranaires interagissent avec des protéines d'échafaudage cytoplasmiques, les protéines de la famille zona occludens (ZO-1, ZO-2 et ZO-3), qui régulent leur polymérisation, couplent les TJs au cytosquelette d'actine et aux autres protéines de la polarité cellulaire ou de signalisation. Cette zone d'importantes interactions protéiques autour des protéines ZOs est appelée «plaques cytoplasmiques» (Guillemot et al., 2008; Vasileva et al., 2017). Les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3, sont structurellement similaires, contiennent toutes deux domaines importants les interactions protéine-protéine : le domaine PDZ et le domaine SH3. La structure ainsi que le rôle de ZO-1 dans la formation des jonctions serrées seront traités en détails dans la suite de ce manuscrit.

Au niveau moléculaire, les interactions des protéines formant les jonctions serrées sont indépendantes du calcium (Hernandez et al., 2007; Spadaro et al., 2014; Umeda et al., 2004). Cependant, une chute de la concentration en calcium extracellulaire à une valeur inférieure à 10µM provoque la destruction de ces jonctions en même temps que les jonctions adhérentes, qui sont calcium dépendantes (Gonzalez-Mariscal et al., 1990). Il a été montré que la déplétion du calcium est associée à une translocation de la protéine d'échafaudage ZO-1 de la périphérie de la cellule vers le cytoplasme. Le rétablissement d'une concentration normale en calcium extracellulaire permet de relocaliser ZO-1 aux jonctions serrées lors de leur assemblage (Zheng and Cantley, 2007). La destruction des jonctions serrées, observée suite à la déplétion en calcium, est la conséquence directe de la destruction des jonctions adhérentes. En effet, à la différence des jonctions adhérentes, les interactions entre les protéines des jonctions serrées ne sont pas suffisamment fortes pour maintenir seules l'adhérence cellulaire.



Figure 22 : Les protéines transmembranaires des jonctions serrées. Les jonctions serrées comporte 3 protéines transmembranaires : Les claudines et les occludines qui sont constituées d'une chaine polypeptidique traversant quatre fois la membrane et dont les extrémités N-terminale et le C-terminale sont cytoplasmiques ; la protéine JAM (Junctional Adhesion Molecule) qui est composée d'une chaine polypeptidique traversant la membrane une seule fois et dont l'extrémité C-terminale est cytoplasmique alors que l'extrémité N-terminale est extracellulaire. D'après (Tsukita et al., 2001)

3. Rôles des jonctions serrées

Les jonctions serrées jouent deux rôles importants dans l'établissement de la polarité apicobasale des tissus épithéliaux : le rôle de barrière et le rôle de clôture (Figure 23). Le premier consiste à limiter le passage d'eau et de nutriments et d'autres types de molécules à travers l'espace paracellulaire. La voie paracellulaire implique plusieurs protéines des TJs (Anderson and Van Itallie, 1995; Gunzel and Yu, 2013), et fait partie des deux voies essentielles de transport de molécules à travers un épithélium. Le transport transcellulaire (à travers les cellules) et paracellulaire (entre les cellules) de molécules permet l'établissement et le maintient des gradients électrochimiques nécessaires à l'homéostasie des tissus épithéliaux (Marchiando et al., 2010). Le rôle de « clôture» fait référence à leur capacité à empêcher la diffusion libre des protéines et des lipides de la membrane plasmique entre le domaine apical et le domaine basolatéral, maintenant ainsi la polarité apico-basale des cellules épithéliales (Zihni et al., 2016). Certaines études suggèrent que les deux fonctions, barrière et clôture, sont liées et interdépendantes (Hernandez et al., 2007), alors que d'autres suggèrent qu'il est possible d'affecter une fonction sans perturber l'autre (Takakuwa et al., 2000).

En conséquence de leur rôle dans la perméabilité paracellulaire et dans la polarité apicobasale, de nombreuses études suggèrent l'implication des jonctions serrées dans le processus de morphogenèse des structures épithéliales. En effet, il a été montré que les claudines sont essentielles à la formation d'un lumen normal, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Lu et al., 2014). Par exemple, l'altération de l'expression de la protéine Claudine-2 dans les cellules MDCK bloque la formation de vésicules normales avec un seul lumen (Lu et al., 2014). Claudin-2 n'est pas la seule protéine des jonctions serrées à être impliquée dans la morphogenèse des tissus épithéliaux ; une étude plus récente a montré un rôle important pour la protéine ZO-1 (Odenwald et al., 2017).

Les jonctions serrées jouent également un rôle dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules épithéliales (Figure 23). Par exemple, les études réalisées par Balda et al. ont mis en évidence que l'interaction du facteur de transcription ZONAB (ZO-1-associated Nucleic Acid Binding) avec le domaine SH3 de ZO-1 et régulait l'activité du proto-

80



Figure 23 : Les fonctions principales des jonctions serrées. Les jonctions serrées jouent deux rôles importants dans l'établissement de la polarité apico-basale des tissus épithéliaux : le rôle de barrière et le rôle de clôture. Le premier consiste à limiter le passage d'eau, de nutriments et d'autres types de molécules à travers l'espace paracellulaire. Le rôle de « clôture» fait référence à leur capacité à empêcher la diffusion libre des protéines et des lipides de la membrane plasmique entre le domaine apical et le domaine basolatéral. En outre, les jonctions serrées sont décrites pour jouer un rôle dans la signalisation cellulaire en interagissant avec des facteurs de transcription. D'après (Takano et al., 2014).

oncogène erbB-2. A forte densité cellulaire, ZO-1 inhibe l'activité transcriptionnelle de ZONAB en induisant sa séquestration cytoplasmique (Balda and Matter, 2000).

III. La protéine ZO-1

Zonula occludens (ZO) -1 a un poids moléculaire d'environ 220 KDa, et a été la première protéine des TJs a être identifiée (Stevenson et al., 1986). ZO-1 est présent à la fois dans les cellules épithéliales et non épithéliales comme les fibroblastes (Howarth and Stevenson, 1995). En plus d'être localisé essentiellement au niveau des jonctions serrées, ZO-1 peut également se lier aux jonctions adhérentes en interagissant avec la protéine α -catenin (Itoh et al., 1997) ou aux jonctions GAP *via* les connexines (Toyofuku et al., 1998).

Au niveau des jonctions serrées ZO-1 se trouve sous forme soit d'homodimère soit d'hétérodimères en s'associant à ces deux paralogues : ZO-2, une protéine de 160 kD, et ZO-3, protéine de 130 kD. Ces interactions se font *via* le deuxième domaine PDZ de ZO-1 (Utepbergenov et al., 2006). Aucune étude n'est faite pour déterminer le pourcentage des différents types d'homodimères et d'hétérodimères de protéines ZO, mais ce dernier dépend probablement du niveau relatif d'expression des protéines ZO, lui même variable d'une lignée cellulaire à une autre. Il est intéressant de noter que, ZO-2 et ZO-3 ne peuvent pas former des hétérodimères indépendamment de ZO-1 (Wittchen et al., 1999).

1. Structure de la protéine ZO-1

ZO-1 appartient à la famille des guanylate kinases associées à la membrane MAGUKs (Membrane-Associated GUanylate Kinase) et possède plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine: trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un homologue guanylate kinase (GUK) catalytiquement inactif (Figure 24). Ainsi, la protéine ZO-1 peut interagir avec une grande variété de protéines au sein de la plaque cytoplasmique. Parmi les partenaires de ZO-1 on trouve les protéines transmembranaires des jonction serrées : JAMs, claudins et occludin, et ses paralogues cytoplasmiques ZO-2 et ZO-3. De plus, ZO-1 se lie à d'autres

adaptateurs tels que la cinguline et contient un domaine de liaison à l'actine ABR (Actin Binding Region) du coté C-terminal.

Les domaines d'interaction protéique MAGUK (PDZ, SH3 et GUK) sont séparés par des domaines variables appelés « domaines uniques» et numérotés de U(nique)1 à U6. Comme leur nom l'indique, il s'agit de motifs ayant des séquences variables et uniques à chaque protéine ZO. Le motif U5, est requis pour la localisation de ZO-1 en TJ *in vivo* et pour la liaison de ZO-1 à l'occludine *in vitro* (Fanning et al., 2007). En revanche, le motif U6 inhibe la liaison de ZO-1 à l'occludine *in vitro*. L'expression d'une ZO-1 modifiée, dépourvue de U6, induit des brins ectopiques constitués d'occludines et de claudines mais dépourvus de la plupart des protéines de la plaque cytoplasmique (Fanning et al., 2007). Comme dans les autres protéines MAGUKS, les domaines SH3 et GUK de ZO-1 forment une boucle en épingle à cheveux par interaction intramoléculaire permettant de déterminer la position des motifs U5 et U6 et ainsi moduler l'interaction de ZO-1 à l'occludine et aux autres protéines.

2. Les fonctions de ZO-1

ZO-1 est une protéine d'échafaudage, possédant plusieurs domaines d'interaction protéiques. Sa capacité d'interagir avec un nombre important et varié de protéines suggère son implication dans plusieurs processus physiologiques durant le développement embryonnaire et au stade adulte. L'importance fonctionnelle de ZO-1 a été confirmée *in vivo* : l'invalidation de ZO-1 est létale au stade embryonnaire, en raison de l'angiogenèse défectueuse du sac vitellin et de l'apoptose des cellules embryonnaires (Katsuno et al., 2008).

a. Rôle dans la formation des jonctions serrées et l'établissement de la polarité apicobasale

La létalité embryonnaire associée à l'absence de la protéine ZO-1 peut probablement être expliquée par le rôle joué par cette dernière dans la polarité et dans le contrôle de la perméabilité paracellulaire des cellules épithéliales. En effet, des modèles de culture en 3D de cellules épithéliales invalidées pour ZO-1 présentent des défauts au niveau de la polarité

	cingulin, tricellulin						_	
			70-2	JAM	Shroo	CaM		Protein 4.1, cortactin, cinqulin
		Claudins	ZO-3	PLC _{B3}	Apg-2	Occludin		F <u>-acti</u> n
ZO-	-1	PDZ	PDZ	PDZ	SH3 U5	GUK	U6	ABR
				l			;	

Figure 24 : Structure et domaines d'interactions protéiques de ZO-1. ZO -1 a un poids moléculaire d'environ 220 KDa et possède plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine: trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine GUK (guanylate kinase) catalytiquement inactif. D'après (Lye et al., 2010)

et de la perméabilité paracellulaire (Martin-Belmonte and Mostov, 2008; Odenwald et al., 2017).

Les résultats obtenus à partir d'un modèle de culture 2D sont moins cohérents et présente des contradictions concernant le rôle joué par ZO-1 dans la formation des jonctions serrées et dans l'établissement de la polarité apico-basale. Des études réalisées avec des cellules MDCK suggèrent que ZO-1 est nécessaire pour une structure normale des TJs et leur rôle de barrière. Les résultats obtenus montrent que ZO-1 stabilise les jonctions serrées par couplage au cytosquelette péri-jonctionnel (Rodgers et al., 2013; Vandana and Gupta, 2009). De plus, une étude utilisant des nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALENs= Transcription activator-like effector nucleases), une méthode d'édition du génome pour éliminer le gène ZO-1 dans des cellules MDCK, a montré que la déplétion de ZO-1 perturbe la localisation des protéines des jonctions serrées (Tokuda et al., 2014). Une étude plus récente soutient le rôle de ZO-1 dans la formation des jonctions serrées. A travers son interaction avec les filaments d'actine, *via* son le domaine ABR, ZO-1 contribue à la solidité et à l'intégrité des jonctions serrées (Odenwald et al., 2017).

Cependant, d'autres études réalisées à la fois dans des cellules MDCK et des EpH4 ont montré que la déplétion de ZO-1 entraînait seulement un retard dans la formation de la barrière. Une fois que les jonctions serrées sont formées dans des cellules dépourvues de ZO-1, les mesures de la perméabilité pour les ions et les macromolécules (40KDa) ont gardé leur valeurs normales (McNeil et al., 2006; Umeda et al., 2004). Une seconde étude réalisée par Umeda et al utilisant la microscopie électronique a montré que l'aspect structurel des cellules EpH4 polarisées n'était pas affecté par la délétion de ZO-1. Au niveau moléculaire, la distribution des marqueurs apicaux (syntaxine 3 ou moesine) et des marqueurs basolatéraux (E-cadhérine ou erbB2) n'a également pas été affectée et sont en cohérence avec les valeurs des mesures de la perméabilité paracellulaire (Umeda et al., 2006).

b. Autres fonctions de ZO-1

Le rôle de ZO-1 n'est pas limité à la formation des jonctions serrées. Au cours de la polarisation des cellules épithéliales, ZO-1 interagit aussi avec les protéines des jonctions

85

adhérentes, telles que l' α -caténine et AF-6/afadin, au cours de l'assemblage des AJs avant le recrutement de la protéine TJ [147-149]. Une étude récente suggère que l'association de ZO-1 aux jonctions adhérentes *via* l' α -caténine n'est pas requise pour le bon assemblage de ces dernières mais nécessaire pour celle des jonctions serrées. Cette interaction permet de coupler l'assemblage des jonctions adhérentes et des jonctions serrées (Maiers et al., 2013).

ZO-1 joue aussi un rôle dans le contrôle de la prolifération et la différentiation cellulaire. Il a été d'abord montré que la localisation de ZO-1 dépend de la confluence cellulaire. En effet, ZO-1 est localisé dans les noyaux des cellules à faible densité, et devient localisé aux jonctions serrées une fois que les cultures deviennent confluentes (Gottardi et al., 1996). Ceci suggère que ZO-1 peut réguler la croissance cellulaire et la formation de TJ en fonction de la densité cellulaire et l'établissement du contact cellulaire. En effet, les études réalisées par Balda et al. ont mis en évidence que l'interaction du facteur de transcription ZONAB (ZO-1-associated Nucleic Acid Binding) avec le domaine SH3 de ZO-1 régulait l'activité du proto-oncogene erbB-2. A forte densité cellulaire, ZO-1 séquestre ZONAB au niveau des jonctions serrées, inhibant ainsi son activité transcriptionnelle pro-proliférative (Balda and Matter, 2000). De plus, ZO-1/ZONAB peut influencer l'accumulation nucléaire de Cdk4, un régulateur clé de la transition G1/S (Balda et al., 2003).

IV. L'impact de la polarité polarité apico-basale sur la voie TGF-ß

Les cellules épithéliales ont la particularité de développer, quand cultivées à forte confluence, une polarité apico-basale et de former ainsi des épithéliums polarisés. Cela, n'est pas sans incidence sur les voies de signalisation cellulaires telles que les facteurs de croissance.

En 1995, Hobert et al. ont été les premiers à découvrir que les récepteurs EGFR se localisent exclusivement au niveau du domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées. Cette observation a été confirmée par la suite grâce aux travaux de He et al. montrant que l'EGFR contient deux signaux d'adressage à la membrane basolatérale, les motifs PXXP et LL (He et al., 2002). De plus, les ligands EGFR sont sécrétés exclusivement à partir du domaine apical, et la perte de polarité des cellules épithéliales est nécessaire pour permettre l'interaction

entre les récepteurs de HER2/ErbB2, membres de la famille EGFR, et leur activateur, l'héréguline (Vermeer et al., 2003), conduisant à la prolifération cellulaire. Plus tard, une autre étude a montré un effet similaire de la polarité apico-basale sur la signalisation BMP (Bone Morphogenetic Protein), un autre membre de la superfamille TGF-ß. Les récepteurs de la voie BMP se localisent exclusivement au niveau basolatéral dans les cellules épithéliales polarisées, et seule une induction basale permet leur activation (Saitoh et al., 2013).

La voie TGF-ß est aussi impactée par l'établissement de la polarité apico-basale. Des études réalisées en utilisant des cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby canine kidney) et EpH4, montrent que la localisation du **récepteur** au TGF-ß change suite à l'établissement de la polarité apico-basale (Murphy et al., 2004; Nallet-Staub et al., 2015). A faible densité cellulaire, ces cellules expriment les récepteurs TßRI et TßRII de façon homogène au niveau de leur membrane cytoplasmique. Cependant, cette distribution change après l'établissement de la polarité apico-basale, ces récepteurs sont adressés vers la surface basolatérale des cellules MDCK et EpH4 polarisées (Murphy et al., 2004). L'analyse du récepteur de type II a montré qu'un élément unique, appelé le motif LTA, entre les résidus 529 et 538, était nécessaire et suffisant pour l'adressage basolatéral de ce dernier (Murphy et al., 2007). La sécrétion du ligand TGF-ß est également affectée par la polarité apicobasale. Cependant, à l'inverse des récepteurs, l'étude du ligand TGF-ß dans des cellules MDCK montre que ce dernier est secrété uniquement du domaine apical de la membrane cytoplasmique (Murphy et al., 2004).

L'ensemble des résultats concernant l'étude des récepteurs et du ligand TGF-ß, suggère un rôle potentiel de l'établissement de la polarité apico-basale dans la modulation de la voie TGF-ß dans les cellules épithéliales. Cette hypothèse remettra en question l'étendue des activités autocrines et paracrines du TGF-ß et leurs impact *in vivo* sur les tissus épithéliaux. De plus, la complexité supplémentaire que pourrait apporter la polarité apico-basale à la signalisation TGF-ß, pourrait également remettre en question l'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo telle qu'elle est actuellement décrite dans la littérature (voir chapitre 2, section IV de ce manuscrit).

Ainsi, pour une compréhension réelle des voies de signalisations dans les cellules épithéliales et de leurs interactions, il est crucial de les étudier dans un modèle qui prend en compte l'influence de l'établissement de la polarité apico-basale sur ces dernières. Les travaux effectués durant ma thèse ont permis d'accomplir les objectifs suivants :

 A mon arrivé dans l'équipe, j'ai participé à la finalisation des travaux visant à définir l'implication de l'établissement de la polarité apico-basale dans la modulation de la voie TGF-ß et son interaction avec la voie Hippo.

Les résultats obtenus sont présentés par la suite sous forme d'article intitulé « Cell density sensing alters TGF-beta signaling in a cell-type-specific manner, independent from Hippo pathway activation » publié en mars 2015 dans le journal *Dev Cell (Flore Nallet-Staub, Xueqian Yin, Criste Gilbert, Veronique Marsaud, Saber Ben Mimoun, Delphine Javelaud, Edward B. Leof, and Alain Mauviel)*

II. J'ai ensuite continué à étudier les paramètres biophysiques associés à l'établissement de la polarité apico-basale de plusieurs lignées épithéliales. Cela a permis d'optimiser notre modèle d'étude, utilisé par la suite pour examiner le rôle de la protéines ZO-1 dans la formation des jonctions serrées et dans la résistance des épithéliums polarisés à l'induction apical au TGF-ß.

Les résultats obtenus sont présentés par la suite sous forme d'article intitulé « Establishment of apico-basal polarity in epithelial cells: implication for their resistance to apical TGF-ß and role of ZO-1 » (**Saber Ben Mimoun**, Véronique Marsaud, Cristele Gilbert and Alain Mauviel), en cours de préparation.

III. Durant ma thèse, j'ai également participé à la rédaction d'une revue scientifique publiée dans un journal à comité de lecture, figurant dans la partie Annexes de ce manuscrit. Elle est intitulée « Molecular mechanisms underlying TGF-ß/Hippo signaling crosstalks - Role of baso-apical epithelial cell polarity », et parue dans le journal *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* en mai 2018 (**Ben Mimoun** and Mauviel, 2018).

RESULTATS

Article I

Cell density sensing alters TGF-beta signaling in a cell-type-specific manner, independent from Hippo pathway activation

Flore Nallet-Staub, Xueqian Yin, Cristèle Gilbert, Veronique Marsaud, **Saber Ben Mimoun**, Delphine Javelaud, Edward B. Leof, and Alain Mauviel.

Dev Cell, mars 2015

Résumé :

Les contacts cellule-cellule activent des signaux contrôlant le processus d'inhibition de contact, un phénomène par lequel les cellules normales cultivées en monocouches présentent une prolifération réduite, voire un arrêt de croissance, lorsqu'elles atteignent la confluence. Cette propriété est souvent perdue lors de la progression néoplasique ou de la transformation *in vitro*. Récemment, des indices concernant les mécanismes par lesquels les cellules perçoivent les contacts avec d'autres cellules ont émergé. En particulier, la voie Hippo, a été identifiée comme un acteur majeur dans ce processus (Zhao et al., 2007). En effet, l'activation de la signalisation Hippo par la densité cellulaire conduit à la phosphorylation et l'exclusion nucléaire de ses substrats YAP et TAZ, restreignant ainsi leur rôle de co-activateurs transcriptionnels, et par conséquent, la prolifération cellulaire.

La densité cellulaire et la signalisation d'Hippo ont également été rapportées pour bloquer les réponses du facteur de croissance transformant ß (TGF-ß), basées sur la séquestration cytoplasmique, par phospho-YAP/TAZ, des complexes SMADs activés. Ces derniers sont des facteurs de transcription et leur translocation nucléaire est nécessaire pour l'induction des gènes cibles de la voie TGF-ß.

Dans ce travail, nous avons examiné la réponse au TGF-ß en fonction de la densité cellulaire dans une variété de lignés cellulaires et nous fournissons des preuves que la polarisation

des cellules épithéliales interfère avec la signalisation TGF-ß bien en amont et indépendamment de la localisation de YAP/TAZ. Notre modèle se base sur la rétention au niveau baso-latéral des récepteurs de type I et II du TGF-ß suite à l'établissement de la polarité apico-basale, empêchant ainsi le ligand TGF-ß libéré de façon apicale d'accéder à ses récepteurs. Cependant, l'ajout du TGF-ß au niveau baso-latéral reste tout à fait efficace pour induire l'activation de la voie TGF-ß dans les cellules épithéliales polarisées.

Ainsi, nos résultats démontrent que l'inhibition de la voie TGF-ß par densité cellulaire est limitée aux cellules épithéliales polarisées et reflète une distribution polarisée des récepteurs TGF-ß, ce qui affecte donc l'activation des SMADs indépendamment de l'activation de la voie Hippo.



Cell Density Sensing Alters TGF-β Signaling in a Cell-Type-Specific Manner, Independent from Hippo Pathway Activation

Flore Nallet-Staub,^{1,2,3,4} Xueqian Yin,⁵ Cristèle Gilbert,^{1,2,3,4} Véronique Marsaud,^{1,2,3,4} Saber Ben Mimoun,^{1,2,3,4} Delphine Javelaud,^{1,2,3,4} Edward B. Leof,^{5,*} and Alain Mauviel^{1,2,3,4,*}

¹Institut Curie, Centre de Recherche, Team "TGF-β and Oncogenesis," Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, 91400 Orsay, France ²INSERM U1021, 91400 Orsay, France

³CNRS UMR 3347, 91400 Orsay, France

⁴Université Paris XI, 91400 Orsay, France

⁵Thoracic Disease Research Unit, Departments of Biochemistry/Molecular Biology and Medicine, Mayo Clinic Cancer Center, Rochester, MN 55905, USA

*Correspondence: leof.edward@mayo.edu (E.B.L.), alain.mauviel@curie.fr (A.M.) http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.011

SUMMARY

Cell-cell contacts inhibit cell growth and proliferation in part by activating the Hippo pathway that drives the phosphorylation and nuclear exclusion of the transcriptional coactivators YAP and TAZ. Cell density and Hippo signaling have also been reported to block transforming growth factor β (TGF- β) responses, based on the ability of phospho-YAP/TAZ to sequester TGF- β -activated SMAD complexes in the cytoplasm. Herein, we provide evidence that epithelial cell polarization interferes with TGF-β signaling well upstream and independent of cytoplasmic YAP/TAZ. Rather, polarized basolateral presentation of TGF-B receptors I and II deprives apically delivered TGF- β of access to its receptors. Basolateral ligand delivery nonetheless remains entirely effective to induce TGF- β responses. These data demonstrate that cell-type-specific inhibition of TGF-β signaling by cell density is restricted to polarized epithelial cells and reflects the polarized distribution of TGF- β receptors, which thus affects SMAD activation irrespective of Hippo pathway activation.

INTRODUCTION

Cell-cell contacts drive signals controlling the process of contact inhibition, a phenomenon whereby normal cells grown in monolayers exhibit reduced proliferation, even growth arrest, when reaching confluency. This property is often lost during neoplastic progression or in vitro transformation. Recently, clues regarding the mechanisms by which cells sense contacts with other cells have emerged. In particular, the Hippo pathway, originally identified as a mechanism controlling organ size in *Drosophila* via inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis, was identified as a major player in this process (Zhao et al., 2007). Specifically, it was found that activation of Hippo signaling by cell density sensing leads to phosphorylation and nuclear exclusion of its effector molecules YAP and TAZ, thereby restraining the nuclear activity of the latter, which otherwise act as co-transcriptional activators of TEAD and other transcription factors to promote cell proliferation. In polarized cells, the apical-basal cell polarity determinant Crumbs was found to directly regulate Hippo signaling, and thus YAP/TAZ nucleo-cytoplasmic localization and function (Chen et al., 2010; Robinson et al., 2010). Remarkably, YAP and TAZ may also undergo nuclear exclusion upon mechanical stress induced by extracellular matrix rigidity and cell geometry, in a process requiring Rho GTPase signaling and the actomyosin cytoskeleton, independent from Hippo activity (Dupont et al., 2011).

Various mechanisms have been described whereby the Hippo pathway and/or its effectors YAP/TAZ interfere with the transforming growth factor beta (TGF-B)/SMAD cascade (Mauviel et al., 2012). We initially identified YAP as a SMAD7-interacting protein that cooperates with the latter to block TGF- β receptor type I (TβRI) function, thereby inhibiting TGF-β signaling (Ferrigno et al., 2002). In Drosophila, Yorkie (YAP homolog) was found to bind and potentiate Mad (SMAD homolog)-driven transcription (Alarcón et al., 2009; Oh and Irvine, 2011), while in mammalian cells, it was found that YAP and TAZ are required for efficient nuclear translocation and transcriptional activity of SMAD complexes in response to TGF- β (Varelas et al., 2008). The same authors also described a mechanism whereby phosphorylated YAP and TAZ, excluded from the cell nucleus upon cell-cell contacts, sequester active SMAD complexes in the cytoplasm, thereby suppressing cellular responses to TGF- β in cells grown at high density (Varelas et al., 2010). The latter findings suggest that confluent cells are not responsive to TGF- β , at odds with a large body of literature on TGF-β. Indeed, in the early days of TGF-B research, the use of dense, confluent cell cultures was often preferred to better understand the broad capacity of TGF- β to regulate gene expression and/or differentiation. For example, confluent skin, gingival or lung fibroblasts (Chung et al., 1996; Daniels et al., 2004; Mauviel et al., 1994; Wrana et al., 1991), keratinocytes (Kon et al., 1999; Mauviel et al., 1996), chondrocytes (Redini et al., 1991), and/or calvarial bone cells (Wrana et al., 1988), to cite a few, all respond to TGF-B with increased or decreased expression of fibrillar and nonfibrillar collagens (Chung et al., 1996; Kon et al., 1999; Mauviel



Figure 1. Impact of Cell Density on TGF-β Signaling

HaCaT keratinocytes, 1205Lu melanoma cells, and EpH4 mouse mammary epithelial cells were grown in either low (LD) or high (HD) density conditions prior to TGF- β (5 ng/ml) stimulation.

(A) Quantitative RT-PCR analysis of PAI-1 expression after a 24-hr TGF- β treatment. Results are expressed as -fold induction by TGF- β in each culture condition and are the mean \pm SD from three independent experiments, each measured in triplicate.

(B) Effect of TGF- β on SMAD3/4-specific transcription. Results are expressed as -fold activation of transiently transfected (CAGA)₉-MLP-luc activity 18 hr after TGF- β addition to the cultures. Results are the mean ± SD of two independent experiments, each performed with triplicate samples.

(C) Western analysis of P-SMAD3 levels without (–) or with (+) 30 min TGF- β stimulation. Actin levels were measured as a control for the specificity of P-SMAD3 changes under each experimental condition. Results from one representative of several independent experiments are shown.

et al., 1994), fibronectin (Daniels et al., 2004; Ignotz et al., 1989), SPARC (Wrana et al., 1991), laminins (Korang et al., 1995), integrins (Heino and Massagué, 1989), proteoglycans (Redini et al., 1991), metalloproteinases and protease inhibitors such as plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) or tissue inhibitor of metalloproteases (Mauviel et al., 1996; Overall et al., 1989). Likewise, early-response genes are efficiently induced by TGF- β in confluent skin fibroblasts and keratinocytes (Mauviel et al., 1993, 1996). The broad ability of TGF- β to control the turnover of extracellular matrix and cell adhesion molecules largely contributes to its capacity to orchestrate tissue homeostasis and function, to promote tissue repair, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and to mediate tissue fibrosis when signaling is deregulated and excessive.

Given the conflicting results from the literature pertaining to an important aspect of TGF- β biology (i.e., interference or not of cell-cell contacts with TGF- β signaling), we undertook a broad examination of TGF- β responses as a function of cell density in a variety of cell types. Our results demonstrate that cell contact-induced nuclear exclusion of Hippo effectors YAP and TAZ does not interfere with TGF- β responses, measured as SMAD3 phosphorylation, nuclear translocation, and gene activation. Rather, loss of TGF-*β* responsiveness in dense cell cultures is independent of cell density per se, and appears to be restricted to polarized epithelial cells that undergo a remarkable cell density-dependent shift in TGF-ß receptor (TßR) localization from pericellular at low cell density to exclusively basolateral at high cell density when tight cell-cell contacts are established. This domain-specific receptor localization, in turn, prevents SMAD phosphorylation and associated gene responses from apically delivered TGF- β ligand, while TGF- β signaling is fully efficient when initiated from the basolateral sides of polarized cells. These results shed new light on the relationship between cellular density and TGF-B responses, independent from the nucleocytoplasmic shuttling of Hippo pathway effectors.

RESULTS

In Most Cell Types, Cell Density Does Not Inhibit TGF- β Responses

We first examined how cell density affects TGF- β signaling in various cell lines from distinct lineages that have classically been used for TGF- β signaling studies, including HaCaT keratinocytes (Alarcón et al., 2009; Gomis et al., 2006; Levy and Hill, 2005; Reynisdóttir et al., 1995), 1205Lu and other human melanoma cell lines extensively characterized for functional SMAD signaling implicated in their invasive and metastatic potential (Alexaki et al., 2010; Javelaud et al., 2007; Mohammad et al., 2011; Rodeck et al., 1999), human pancreatic PANC-1 (Dennler et al., 2007; Ellenrieder et al., 2001; Nicolás and Hill, 2003) and breast MDA-MB-231 carcinoma cells (Kang et al., 2003; Yin et al., 1999), as well as mouse mammary epithelial EpH4 cells (Varelas et al., 2010). As shown in Figures 1 and S1, in all but EpH4 cells, there was no remarkable attenuation in the extent of TGF-\beta-induced expression of the prototypic target gene PAI-1 (Figures 1A and S1A) or activity of a SMAD3/4-specific reporter in transient cell transfection assays (Figures 1B and S1B). In fact, the extent of *PAI-1* induction by TGF- β was even higher in HaCaT and 1205Lu cells grown at high density than in proliferating sparse cells.

The primary signaling event downstream of activated TGF- β receptors is SMAD3 phosphorylation. Remarkably, in dense EpH4 mouse mammary cell cultures, reduction in SMAD-specific transcription and target gene activation in response to TGF- β was associated with an almost complete lack of SMAD3 phosphorylation (Figure 1C), which was not affected by cell density in any of the other five cell lines that were examined (Figures 1C and S1C).



Figure 2. Independent Regulation of SMAD2/3 Nuclear Translocation and Density-Dependent TAZ Nucleo-Cytoplasmic Localization (A–C) Simultaneous detection of SMAD2/3 and TAZ in HaCaT keratinocytes (A), 1205Lu melanoma cells (B), and EpH4 mouse mammary epithelial cells (C). Cells were grown on glass coverslips in either low (LD) or high (HD) density conditions prior to TGF-β (30 min, 5 ng/ml) stimulation, then subjected to simultaneous immunofluorescent detection of SMAD2/3 (green) and TAZ (red). Experiments were repeated four to six times, depending on cell line.

Nuclear Translocation of SMAD2/3 in Response to TGF- β Is Independent from TAZ Nuclear Exclusion Induced by Cell Density

The previous data contrast with the report showing that TGF- β induces SMAD3 phosphorylation in confluent EpH4 cells (Varelas et al., 2010). Since Hippo pathway activation has been identified as a sensor for cell-cell contacts (Zhao et al., 2007), together with the fact that phosphorylation of SMAD3 is a prerequisite for its nuclear accumulation and subsequent gene responses, TAZ and SMAD2/3 nucleo-cytoplasmic localization were studied in parallel by indirect immunofluorescence in several cell types grown at low or high density, in the absence or presence of TGF- β . As shown in Figure 2A, HaCaT cells grown at low density exhibited both cytoplasmic and nuclear TAZ, while high-density cultures exhibited remarkable nuclear exclusion of TAZ, (red fluorescence), independent from TGF- β . Parallel examination of SMAD2/3 localization following a 30-min TGF- β stimulation of HaCaT cells grown at low or high density indicated strong nuclear accumulation of P-SMAD3 in response to TGF- β , whether at low or high density (Figure 2A, green fluorescence), without changes in TAZ localization in response to TGF- β . Similar results were obtained in 1205Lu cells (Figure 2B). Thus, in these two cell types, nuclear accumulation of P-SMAD3 occurs in response to TGF- β despite TAZ nuclear exclusion resulting from cell density sensing, indicating that the two proteins are able to independently shuttle between the cytoplasm and nucleus. Quantitation of nuclear SMAD3 and TAZ in these three cell lines at high cell density in absence or presence of TGF- β is provided in Figure S2A. Consistent with the findings in HaCaT and 1205Lu cells, efficient SMAD3 nuclear translocation was also observed in fibroblasts treated with TGF- β , whether at low or high cell density (Figure S2B).

In EpH4 cells, however, while TAZ was efficiently excluded from the cell nucleus at high density, SMAD3 nuclear accumulation only occurred in sparse cell cultures treated with TGF- β , not in confluent cells (Figures 2C and S2A). These data are consistent with the absence of SMAD3 phosphorylation and target gene activation observed in these cells at high density (see Figure 1) and fit the established model of TGF- β /SMAD signal transduction whereby an absence of SMAD3 phosphorylation precludes subsequent downstream signaling (reviewed in Massagué, 2012). They are, however, at odds with the model whereby active (phosphorylated) SMAD complexes are sequestered in the cytoplasm by P-TAZ in confluent cells (Varelas et al., 2010).

The Extent of TGF- β Signaling Does Not Rely upon Cellular TAZ—and YAP—Levels

It has been suggested previously that TAZ levels regulate the extent of TGF- β signaling (Varelas et al., 2008). Our data presented above do not fit this model because SMADs and TAZ localization in either the cytoplasm or nucleus of cells appear to be under distinct regulatory control mechanisms. In that these findings significantly impact current models of TGF- β signaling, the apparent lack of interference of Hippo pathway effectors with SMAD nuclear translocation observed in keratinocytes and melanoma cells (see Figures 2A and 2B) was further substantiated by simultaneous knockdown of TAZ and it paralog YAP (Nallet-Staub et al., 2014). Despite a 95% reduction in both TAZ and YAP protein levels (Figure S3A), there was no significant alteration in the extent of TGF- β target gene induction, as measured by qRT-PCR: induction of *PAI-1* was essentially identical in control- and siYAP/TAZ-transfected cells (Figure S3B).

Last, to further confirm the independence of P-SMAD3 nuclear translocation and Hippo effectors, we took advantage of recently established human melanoma cell lines in which stable TAZ knockdown was obtained by lentiviral delivery of a specific shRNA directed against TAZ (Nallet-Staub et al., 2014). These cell lines fit the purpose of these experiments as they express much higher levels of TAZ than YAP1/2 (Nallet-Staub et al., 2014). TAZ knockdown in 1205Lu melanoma cells had no effect on TGF-β-induced SMAD3 nuclear accumulation (Figure S3C) target gene responses (Figure S3D), and induction of SMAD3/ 4-specific transcription measured in transient cell transfection assays with the (CAGA)₉-MLP-luc reporter (Figure S3E). Likewise, in the WM852 melanoma line, knocking down TAZ did not attenuate the induction of GLI2, PAI-1, CTGF, and SMAD7 by TGF- β (Figure S3F), nor did it impact TGF- β -driven SMAD3/4-specific transcription in SKmel28 melanoma cells (Figure S3G).

Hippo pathway activation upon cell density sensing is a widespread phenomenon affecting a variety of cell types (reviewed in Zhao et al., 2010). Yet, we found no evidence that it might interfere with SMAD nuclear accumulation in response to TGF- β as (a), altering endogenous levels of YAP/TAZ did not attenuate TGF- β responses (Figure S3) and (b), in TGF- β -responsive cells, TGF- β -driven nuclear accumulation of SMAD2/3 occurred under conditions that excluded TAZ from the nucleus (e.g., dense cell cultures; Figure 2). Specifically, out of the six cell lines tested, only Eph4 cells lost TGF- β responsiveness at high cell density. Moreover, this appeared to be due to a lack of SMAD3 phosphorylation, the primary event downstream of TGF- β receptors that initiates the signaling cascade, not to cytoplasmic retention of active SMAD complexes.

Loss of TGF- β Responsiveness in Polarized Epithelial Cells Is Restricted to Their Apical Side

Since EpH4 cells similarly exhibited density-dependent Hippo pathway activation, measured as nuclear exclusion of TAZ, yet uniquely lacked P-SMAD nuclear accumulation in response to TGF- β , we hypothesized that this cell-type specificity might be associated with their capacity to establish baso-apical polarity when grown at high density. To determine whether loss of TGFβ responsiveness due to lack of SMAD3 phosphorylation at high cell density is due to the establishment of cell polarity and/or specific alterations of TGF-B receptor localization, we performed parallel examination of TGF- β responses in EpH4, MDCK, and AKR-2B cells. Both EpH4 and MDCK cells are of epithelial origin and differ from the latter fibroblast cultures by their distinct basoapical polarized phenotype at high culture density. In a first set of experiments, monolayer cultures at low and high density were compared for SMAD3 phosphorylation in response to TGF- β . As shown in Figure 3A, a 30-min stimulation with TGF- β resulted in efficient SMAD3 phosphorylation in all three cell lines at low density while in dense cultures, significant SMAD3 phosphorylation was solely observed in the AKR-2B fibroblasts, consistent with the EpH4 results presented in Figure 1.

Because biochemical assays dependent upon cell density in tissue culture plates are highly sensitive to any disruption of the confluent monolayer, confluent AKR-2B, EpH4, and MDCK cells in Transwell cultures were stimulated with TGF- β from either the apical or basal reservoir, then assessed for SMAD3 phosphorylation. A schematic of the Transwell culture system is provided in Figure 3B. In AKR-2B fibroblasts, TGF- β induced SMAD3 phosphorylation from either reservoir (Figure 3B, left upper image, lanes 3 and 4). On the other hand, EpH4 and MDCK cells showed domain-specific responses, with an absence of SMAD3 phosphorylation when exposed to TGF- β on their apical side while phosphorylation was high when TGF- β was added to the basolateral (BL) compartment (Figure 3B, middle and bottom left images, compare lane 3 [apical stimulation] with lane 4 [BL stimulation]). Thus, at high density in Transwell cultures dishes, non-polarized cells like AKR-2B fibroblasts maintain intact TGF- β signaling whereas polarized cells exhibit domain-specific SMAD3 phosphorylation. Loss of apical TGF- β responsiveness in Transwell cultures is reminiscent of what is observed in confluent monolayer epithelial cultures whereby TGF-ß is essentially delivered apically to the cells (see schematic diagrams in Figures 3A and 3B).



Figure 3. Plasma Membrane Domains Control Cell- and Density-Specific TGF- β Responsiveness

(A) Western analysis of P-SMAD3 (left) and SMAD3 (right) levels in AKR-2B fibroblasts, EpH4, and MDCK epithelial cells grown at low (LD) or high (HD) density monolayer cultures (schematic) following a 60 min TGF- β stimulation.

(B) AKR-2B, MDCK, and EpH4 cells were grown in monolayer (at LD) or Transwell cultures (schematic). P-SMAD3 (left) and SMAD3 levels (right) were determined by western blotting in monolayer cultures following 60 min stimulation in the absence (–) or presence (+) of TGF- β or subsequent to Transwell apical (AP) or basolateral (BL) TGF- β addition.

(C) Confluent monolayers of EpH4 cells were transduced with either TAT-Smad3 (left) or TAT-Smad3P (right). Forty-five minutes later, cells were fixed and subcellular localization of TAT-Smad3 and TAT-Smad3P was assessed by confocal microscopy. Representative results are shown. Nuclei (blue) were stained with DAPI.

(D) Immunofluorescent detection of SMAD3 in polarized EpH4 cells by confocal microscopy following a 60 min incubation with TGF- β added either to the apical (AP, left) or basolateral (BL, right) Transwell chamber.

To directly address the issue of whether active SMAD complexes may be sequestered in the cytoplasm of confluent monolayer cultures of EpH4 cells, we took advantage of TAT-fusion cell-penetrating peptide technology and generated cell-permeable TAT-SMAD3 protein. Specifically, confluent monolayers of EpH4 cells were transduced with TAT-SMAD3, subjected or not to in vitro phosphorylation by activated TBRI (see Experimental Procedures). As shown in Figure 3C, while TAT-SMAD3 was almost exclusively localized in the cytoplasm (left image, nucleo/cvtoplasmic ratio of 0.3 ± 0.05), a large portion of TAT-SMAD3P proteins directly accumulated in the nucleus of cells (right image, nucleo/cytoplasmic ratio of 1.8 ± 0.1), directly establishing that SMAD3 phosphorylation is sufficient for its nuclear accumulation. In another set of experiments, polarized EpH4 cells in Transwell cultures were treated with TGF- β added apically or basolaterally. Remarkably, efficient SMAD3 nuclear accumulation in response to TGF-ß was exclusively observed when the latter was delivered basolaterally, not apically (Figure 3D, nucleo/cytoplasmic ratios of 5.5 ± 0.2 versus 0.4 ± 0.1 , respectively). Thus, in these two complementary approaches, there was minimal cytoplasmic retention of P-SMAD3 in response to high cell density, because SMAD3 phosphorylation was always associated with nuclear accumulation. These data indicate that loss of apical TGF- β responsiveness in confluent EpH4 cells is due to lack of SMAD3 phosphorylation, not to cytoplasmic sequestration of P-SMAD3, as initially proposed (Varelas et al., 2010).

Loss of Apical TGF- β Responsiveness in Polarized Epithelial Cells Reflects Exclusive Basolateral TGF- β Receptor Expression

The aforementioned lack of SMAD3 phosphorylation in polarized cells exposed apically to TGF- β may reflect either an absence of

receptors at the apical surface, or an inability of such receptors to couple with the signaling machinery. In initial experiments to analyze the dynamics of $T\beta R$ localization as a function of cell density, AKR-2B, EpH4, and MDCK cells were grown as lowand high-density monolayer cultures and transiently transfected with tagged TBRI or TBRII expression vectors. Their respective cellular localization was analyzed by confocal microscopy. As shown in Figure 4A (upper image), no defined polarity was observed for either T_βRI or T_βRII in low density (LD) cultures and there was no difference in their expression pattern between fibroblasts and epithelial cells. In contrast, at high cell density (HD, Figure 4A, lower image), whereas no changes in receptor localization were observed for AKR-2B fibroblasts, both receptors showed a strict basolateral expression in EpH4 and MDCK epithelial cells. The same experiments performed in Transwell culture dishes with EpH4 cells at high density refined the data, with an exclusive localization of both T β RI and T β RII on the basolateral sides of EpH4 cells when cell-cell contacts are established (Figure 4B).

To validate these transient transfection findings, we next performed surface biotinylation assays and examined endogenous T β RI and T β RII in AKR-2B, EpH4, and MDCK cells grown as monolayers at low or high density. These experiments revealed a dramatic reduction in T β RI and T β RII expression levels at the surface of EpH4 and MDCK cells, not in AKR-2B fibroblasts, at high versus low density (Figure 4C), consistent with the data from Figure 3A. These results explain the dramatic drop in SMAD3 phosphorylation specifically observed in confluent EpH4 cells in response to TGF- β (Figures 1C and 3A). T β RI and T β RII levels in AKR-2B fibroblasts remained relatively unchanged, irrespective of culture density (Figure 4C). Similar assays were next performed using EpH4 and MDCK cells grown in Transwells to promote their polarization. Polarity of the epithelial sheets



Figure 4. Loss of Apical TGF- β Responsiveness in Polarized Epithelial Cells Reflects Exclusive Basolateral TGF- β Receptor Expression

(A) IF detection of transiently transfected Myc-T β RI and HA-T β RII in low density (LD, upper) and high density (HD, lower) monolayer cultures of AKR-2B, MDCK, and EpH4 cells. Images are represented as XZ cross-sections of transfected cells.

(B) IF detection of transiently transfected Myc-T β RI and HA-T β RII in polarized Transwell cultures of EpH4 cells. Two representative XZ cross-sections of transfected cells are shown. Nuclei (blue) were stained with DAPI.

(C) Surface biotinylation assays of endogenous $T\beta RI$ and $T\beta RII$ in AKR-2B, EpH4, and MDCK cells grown in low- or high-density monolayer cultures.

(D) Apical (AP) and basolateral (BL) surface biotinylation assays of endogenous T β RI and T β RII in MDCK and EpH4 cells in monolayer (lowdensity) or Transwell cultures (high density, polarized). Cell proteins were biotinylated either from the medium (monolayer on plastic, low density) or from the apical or basolateral medium in the case of high density polarized transwell cultures. After surface biotinylation, proteins were immunoprecipitated with streptavidin-agarose

and then detected by blotting with the appropriate TGF- β receptor or E cadherin antibody. Lanes C and T reflect immunoprecipitated protein in the absence of biotinylation (C) or in monolayer for total labeling (T), respectively. E-cadherin was detected to serve as a marker of basolateral cell surfaces. (E) Quantitative reverse transcriptase–PCR analysis of *JUNB*, *CTGF*, and *SMAD7* expression in polarized EpH4 cells incubated without (–) or with TGF- β (2 hr) added either in the apical (AP) or basolateral (BL) compartment of Transwells. Results are expressed as -fold induction by TGF- β and are the mean ± SD from two independent experiments, each measured in triplicate.

formed by EpH4 and MDCK cells was verified with an inulin assay that indicated an absence of apical to basolateral flux in these cells, as opposed to what is observed in confluent fibroblasts under the same culture conditions (see Figure S4). Remarkably, unlike cells grown as low-density monolayers (T), neither EpH4 (left image) nor MDCK (right image) cells polarized in Transwell cultures expressed T_βRI or T_βRII on their apical (AP) surface (Figure 4D), only on their basolateral (BL) sides, in agreement with previous observations from us and others using various cell models (Murphy et al., 2004, 2007; Yakovich et al., 2010; Snodgrass et al., 2013). Consistent with SMAD3 phosphorylation and TβR localization data shown above, apically delivered TGF-β (AP) had little capacity to induce JUNB, CTGF, or SMAD7 gene expression in polarized EpH4 cells, contrasting with the solid transcriptional response that we observed when TGF-B was added to the BL compartment (Figure 4E).

As seen from the experiments above, a major discrepancy exists between the published data by Varelas et al. (2010), who observed SMAD3 phosphorylation in dense, polarized EpH4 cell monolayer cultures, without subsequent nuclear SMAD complex accumulation (Varelas et al., 2010) and ours. Specifically, our data suggest that lack of downstream signaling results from an absence of apical TGF- β receptors and subsequent SMAD3 phosphorylation in polarized EpH4 cells, not YAP/TAZ driven SMAD3 cytoplasmic sequestration. Although all these experiments were performed under conditions that closely followed those described in (Varelas et al., 2010; TGF- β stimulation 48 hr/60 hr after plating at a density of 250,000cells/well in 24well plates), it was possible that these divergent conclusions might result from discrete differences in experimental conditions whereby their data may have been obtained when cells were at an intermediate/early stage of cell polarization whereas ours are fully polarized. To address that issue, kinetic experiments were performed that combined parallel examination of $T\beta RI$, TβRII, and E-cadherin surface expression, together with the capacity of TGF- β to induce both SMAD3 phosphorylation and target gene induction at various time points following cell seeding. EpH4 cells were seeded at a density equivalent to that of 250,000cells/24-well plate in monolayer cultures and TBRI, TβRII, and E-cadherin levels were determined at 8, 24, 48, and 72 hr post-plating by surface biotinylation assays. This approach thus allows a determination of the amount of receptors available for apically delivered TGF- β over the course of cell polarization. As shown in Figure 5A, surface expression of both T β RI and TβRII was maximal at the 8-hr time-point, slightly decreased 24 hr after plating, and was absent from the cell surface at both 48 and 72 hr after cell seeding (Figures 4C and 4D). Remarkably, E-cadherin in the same samples was detectable up to 48 hr, indicating that in EpH4 cells, TGF-β receptors relocalize basolaterally faster than E-cadherin does. In other words, TβRs disappear from the apical cell surface before cells achieve full polarity. Phosphorylation of SMAD3 in response to TGF- β and induction of target gene expression (JUNB, CTGF, and SMAD7) followed the same pattern observed for TBR surface expression: both were maximal at both 8 and 24 hr after cell seeding, and largely attenuated at the later time points (Figures 5B and 5C,



Figure 5. T β R Basolateral Relocalization during EpH4 Cell Polarization: Implication for TGF- β Signaling

EpH4 mouse mammary epithelial cells were grown in high-density conditions (see Experimental Procedures).

(A) Surface biotinylation assays of endogenous $T\beta RI$, $T\beta RII$, and E-cadherin performed at various time points following cell seeding. One of two experiments with similar results is shown.

(B) Western analysis of P-SMAD3 levels following a 2-hr TGF- β stimulation at various time points following cell seeding. Upper panel: representative blot from one of five experiments that gave similar results. Lower: Densitometric analysis of P-SMAD3 levels. Results are expressed as -fold induction by TGF- β at each time-point.

(C) Quantitative reverse transcriptase–PCR analysis of *JUNB*, *CTGF*, and *SMAD7* expression in EpH4 cells incubated without (–) or 2 hr with (+) TGF- β at various time points following cell seeding. Results, expressed as -fold induction by TGF- β at each time point are the mean \pm SD from five independent experiments, each measured in triplicate.

respectively). This is consistent with the data presented in Figures 3 and 4 obtained 48 hr after cell plating. Thus, these kinetic experiments did not identify a time-point following TGF- β receptor binding whereby SMAD3 phosphorylation would occur while downstream events would be blunted in response to cell density driven Hippo activation, as reported by Varelas et al. (2010). Rather, they support our experiments described above that TGF- β -induced SMAD3 phosphorylation is followed by nuclear accumulation of activated SMAD complexes and subsequent target gene activation. The absence of apical TGF- β signaling in polarized cells, as is observed at 48 hr after cell plating, reflects the basolateral relocalization of TGF- β receptors that takes place during the establishment of polarity.

Disruption of Cell-Cell Contacts in Polarized EpH4 Cells by Ca²⁺ Depletion Restores SMAD3 Phosphorylation and Downstream Target Gene Activation in Response to Apically Delivered TGF- β

Polarized epithelial cells establish cell-cell contacts that include Ca^{2+} -dependent tight and adherens junctions. These junctions prevent intercellular diffusion of large molecules and thus, are likely to prevent apically delivered TGF- β from binding its baso-lateral receptors. To test this hypothesis and further confirm the dissociation of density per se, and SMAD3 signaling, we assessed whether disruption of these junctions may be sufficient to restore SMAD3 phosphorylation upon apical TGF- β delivery. As shown in Figure 6A, Ca²⁺ depletion had no effect on TGF- β -induced SMAD3 phosphorylation in sparse EpH4 cultures (LD). On the other hand, disruption of cell-cell contacts from confluent EpH4 cells (HD) by Ca²⁺ depletion restored SMAD3 phosphorylation in response to "apically delivered" TGF- β . These data establish that cell-cell contacts in polarized epithelial

cells control the access of apically available TGF- β ligands to basolateral T β Rs. We next tested whether Ca²⁺ depletion could also restore efficient TGF- β -induced target gene expression in confluent EpH4 cells. As shown in Figure 6B, consistent with the data from Figure 1, confluent EpH4 cells in Ca²⁺-containing culture conditions exhibited very weak activation of target genes (e.g., 2- to 3-fold). A 30-min Ca²⁺ depletion, however, was sufficient to allow solid transcriptional responses, as evidenced by induction of *JUNB*, *CTGF*, and *SMAD7* 10- to 25-fold above control values. Given the basolateral localization of T β Rs in confluent EpH4 cells (see Figures 4A–4D), these data suggest that disruption of Ca²⁺-dependent cell-cell contacts allows paracellular diffusion of apically delivered TGF- β to activate signaling.

DISCUSSION

In summary, we have confirmed previous observations that Hippo pathway activation occurs as a result of cell density sensing (Zhao et al., 2007), and demonstrated that it occurs in a wide variety of cell types, irrespective of their lineage. Second, we have demonstrated that most cell types exhibit functional TGF-B signaling, whether they are at low or high cell density, consistent with a large body of literature. Our data also document that SMAD nuclear accumulation in response to TGF- β is independent from YAP/TAZ levels. Most importantly, we demonstrate that density-driven loss of TGF-β responsiveness is exclusively observed in polarized epithelial cells and reflects the establishment of Ca²⁺-dependent cell-cell contacts that prevent ligand binding to, and activation of, basolaterally expressed TGF-B receptors. This, in turn, prevents SMAD phosphorylation, subsequent nuclear accumulation, and gene responses. A model depicting these findings is shown in Figure 7.



Figure 6. Effect of Ca²⁺ Depletion on TGF- β Response in High-Density Monolayer Cultures of EpH4 Cells

(A) Western analysis of P-SMAD3 levels in EpH4 cells treated without (–) or with (+) TGF- β for 30 min at low (LD) or high (HD) density in monolayer cultures in the presence (+) or absence (–) of Ca²⁺.

(B) Quantitative reverse transcriptase–PCR analysis of *JUNB*, *CTGF*, and *SMAD7* expression in confluent monolayers of EpH4 cells incubated without (–) or with (+) TGF- β (2 hr) in medium with (+) or depleted of (–) Ca²⁺. Results are expressed as -fold induction by TGF- β and are the mean ± SD from two independent experiments, each measured in triplicate.

These data are at odds with some of those from a previous report that concluded that activated SMAD complexes are sequestered in the cytoplasm by P-TAZ (Varelas et al., 2010). In the latter report, the authors gave priority to their finding of a physical interaction between TAZ and SMAD3. Several conclusions were then drawn. For example, Ca²⁺ depletion was found to both drive TAZ nuclear accumulation and restore TGF-B signaling. It is well established that Ca²⁺ is required for the integrity of epithelial cell contacts, which themselves directly control TAZ nucleo-cytoplasmic localization (Chen et al., 2010; Robinson et al., 2010; Zhao et al., 2007). Thus, while we agree with both observations, we believe that the occurrence of the two phenomena is temporally parallel but mechanistically independent. Given the relatively similar levels of expression of YAP/ TAZ (and SMADs) in all cell types, if P-YAP/TAZ were to retain P-SMADs in the cytoplasm, this phenomenon would be rather widespread across various cell types, irrespective of polarization, because cell-cell contact-driven YAP/TAZ nuclear exclusion seems to be a general phenomenon not restricted to polarized cells. This is not the case, as attested by the plethora of data published using confluent cells to study TGF- β responses (see examples and corresponding references in the Introduction)



Figure 7. Schematic Summary of TAZ and SMAD3 Nucleo-Cytoplasmic Shuttling in Response to Cell Density or TGF- β Stimulation in Non-Polarized or Polarized Cells at Low or High Density

At low density (LD), TAZ (red) is nuclear and SMAD3 (green) is cytoplasmic. TGF- β receptors are distributed throughout the cell surface. In response to TGF- β , SMAD3 accumulates in the nucleus where TAZ is located. At high density (HD), TAZ is excluded from the nucleus, as a result of cell density sensing. In non-polarized cells, TGF- β induces SMAD3 nuclear accumulation, while TAZ remains cytoplasmic. In polarized cells (schematically represented with apical villi), apical delivery of TGF- β is without effect on SMAD localization because T β Rs are exclusively basolateral and TGF- β access to its receptors is blocked by intercellular junctions.

and by our demonstration that (a) cell-permeable TAT-PSMAD3 accumulates in the nucleus of confluent transduced EpH4 cells while TAT-SMAD3 does not (Figure 3C), and (b) basolateral stimulation of polarized cells with TGF- β not only leads to phosphorylation, but also to rapid nuclear accumulation of SMAD3 and subsequent target gene transcription (Figures 3B, 3D, and 4E), indicating that phosphorylation of SMAD3 is sufficient to initiate the process of its nuclear translocation.

Physical interactions between YAP/TAZ and SMADs have been studied by various groups. While we originally identified a direct YAP/SMAD7 interaction (Ferrigno et al., 2002), a few research groups have focused their attention on the interactions between YAP/TAZ and receptor-associated SMADs. Massagué's group showed in immunoprecipitation experiments of overexpressed proteins that YAP interacts strongly with SMAD1, which allows for an enhancement of BMP-dependent transcription, while weakly interacting with SMAD3 (Alarcón et al., 2009). This was confirmed by another study with tagged proteins that showed weak affinity of YAP for SMAD3 as compared to SMAD1, yet identified a large transcriptional complex comprising YAP, SMAD3, TEAD, and p300 involved in the upregulation of a subset of TGF-β target genes including CTGF (Fujii et al., 2012). Likewise, in human embryonic stem cells, TGF- β was recently found to recruit SMAD2/3 to TEAD/YAP/TAZ complexes in association with

OCT4, contributing to the regulation of pluripotency genes (Beyer et al., 2013). The latter have been shown independently to be targets for the p300/CBP-interacting protein (p/CIP), which is required for transcriptional activity of various CBP/p300-dependent transcription factors (Chitilian et al., 2014). These data are consistent with the demonstration that external signaling and the core transcriptional machinery form tightly integrated regulatory networks in embryonic stem cells (Chen et al., 2008). Altogether, it would appear that cooperation between YAP/ TAZ and SMAD3 to regulate a subset of TGF-β target genes primarily reflects a nuclear action linked to their shared capacity to bind CBP/p300. Similarly, a recent paper by Varelas' group reported that nuclear YAP/TAZ and SMAD2/3/4 drive invasion and metastasis via shared p300-dependent mechanisms (Hiemer et al., 2014). On the other hand, they concluded that when the Hippo pathway is active (i.e., YAP/TAZ are cytoplasmic), TGF-β-driven tumor suppression and cytostasis occurs via SMAD2/3/4-driven transcription independent of YAP/ TAZ, consistent with our data presented herein.

A critical difference between the works from Wrana's group (Varelas et al., 2008, 2010) and ours resides in the determination of early events regulating TGF- β signaling in relation to cell density. We identify a defect in SMAD3 phosphorylation due to TGFβ receptor localization to basolateral membranes, exclusively in dense polarizable cell lines such as EpH4 or MDCK cells, which then lack downstream TGF-β signaling and gene responses. Surface biotinylation experiments aimed at defining the kinetics of receptor basolateral relocalization during establishment of polarity showed that TBRs disappear from the apical surface of EpH4 cells more rapidly than E-cadherin, suggesting that they establish basolateral domain localization before cells have fully established adherens junctions (i.e., are not fully polarized). In these experiments, target gene transcription in response to apical TGF- β occurred at all time points when SMAD3 was phosphorylated (in other words, when TBRs were still available on the apical surface). We were unable to define a time in the polarization process whereby high density, per se, could have resulted in the cytoplasmic sequestration of P-SMAD complexes. While our findings are fully consistent with previously published observations (Murphy et al., 2004, 2007) of basolateral positioning of TBRs in polarized epithelial cells, we also provide evidence for the restriction of this process to polarized cells because fibroblasts do not undergo any domain-specific reorganization of cell surface receptors in relation to cell density. This may be particularly important as in some models polarized epithelial cells secrete TGF-β ligands from their apical side (Murphy et al., 2004) and luminal TGF- β is commonly observed. As such, it is highly plausible that expression of TGF- β receptors restricted to the basolateral compartment may allow Ca2+dependent cellular junctions, tight and/or adherens, to provide polarized epithelia with a resistance mechanism against TGF- β -induced EMT by preventing TGF- β binding to its receptors. This, in turn, would maintain epithelial integrity and organ function. Loss of polarity, as seen during early carcinogenesis may accelerate TGF-\beta-induced EMT, leading to cell dissociation and metastatic dissemination. Further experiments will be needed to verify these hypotheses.

To conclude, we have uncovered cell-type specific regulation of TGF- β responses by cell density, whereby epithelial cells with

basoapical polarity exhibit strict and exquisite density-dependent redistribution of T β Rs to their basolateral sides, an event that precludes TGF- β responsiveness from their apical compartment. This phenomenon appears to be specific for polarized epithelial cells, as fibroblasts grown to confluency did not undergo any detectable repositioning of T β Rs on their cell surface. We also provide evidence that TAZ nuclear exclusion induced by cell-cell contacts is ubiquitous and that mechanisms driving nucleo-cytoplasmic localization of TAZ and P-SMAD are independent, eventually leading to situations whereby both proteins are fortuitously localized in the same cellular compartment, without obvious functional consequences for TGF- β responses.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

Human lung WI26 and mouse embryonic AKR-2B fibroblasts, immortalized human HaCaT keratinocytes and mouse EpH4 breast epithelial cells, human MDA-MB-231 breast carcinoma cells, canine MDCK kidney epithelial cells, and human PANC-1 pancreatic carcinoma cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Human 1205Lu, WM852, and SKmel28 melanoma cell lines (Alexaki et al., 2008, 2010; Javelaud et al., 2007, 2011a; Rodeck et al., 1999) were grown in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% FBS. For experiments on monolayer cultures, cells were plated at low or high density, 25,000 cells or 250,000 cells in 24-well dishes or proportionally in accordance to dish surface. Twenty-four hours later, medium was replaced to reduce FBS concentration to 1%. TGF- β treatment (30 min to 2 hr, depending on endpoint) was performed either the next day or 4 hr later in the case of kinetic experiments. For Transwell cultures (0.4-µm Costar polycarbonate membranes), cells were plated at a density of 5×10^4 cells/ml in 0.5 ml of culture medium and grown for 3 days prior to experiments. Fully polarized monolayers of MDCK and EpH4 cells were obtained after 3 days, as verified by serial measurements of trans-epithelial resistance with a Millipore EMR2 device, consistent with our previous work (Murphy et al., 2004, 2007; Yin et al., 2013).

Cell-Permeable TAT-Smad3 and Tat-Smad3P Protein Transduction and Detection

TAT-Smad3 or TAT-Smad3P proteins (see Supplemental Experimental Procedures) containing an amino terminal HA epitope tag were added to high density monolayer cultures of EpH4 cells at 37°C for 45 min. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.1%Triton X-100, and blocked by goat serum. TAT-Smad3 and TAT-Smad3P were detected with an anti-HA primary antibody (Cell Signaling) and Cy3-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

RNA Extraction and Gene Expression Analysis by qRT-PCR

RNA extraction and quantitative RT-PCR using the SYBR Green technology have been described previously (Javelaud et al., 2011b; Mohammad et al., 2011). For experiments comparing TGF- β in low- (LD) versus high-density (HD) cultures, cells were seeded at a ratio of 1 to 10 between LD and HD, with cell numbers in HD conditions determined in prior experiments to be sufficient for cell confluency immediately after cell attachment. TGF- β treatment was done 24 hr after cell seeding and luciferase activity was measured 16 hr later. Experiments were performed in triplicate to validate gene expression data in each cell line. Primers used are listed in the Supplemental Experimental Procedures.

Cell Transfections

For reporter assays, cells in monolayer cultures were transfected with the polycationic compound FuGENE (Roche Diagnostics) at 70% to 80% confluency in fresh medium with 200 ng of the SMAD3/4-specific firefly luciferase reporter construct (CAGA)₉-MLP-luc (Dennler et al., 1998) and 50 ng of *Renilla* luciferase expression vector to estimate transfection efficiencies. For experiments comparing TGF- β in LD versus HD cultures, transfections were performed in

10 cm diameter dishes. Cells were split the next day and seeded at a ratio of 1 to 10 between LD and HD. TGF- β treatment was done 24 hr after cell seeding and luciferase was measured 16 hr later. Transient transfection of fully polarized EpH4 cell monolayers in 12-mm Transwells was performed on day 3 after plating, using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Details of the procedure and description of the Myc-tagged T β RI expression vector used for confocal microscopy experiments may be found in (Murphy et al., 2004). HA-tagged T β RII expression vector was a gift from Dr. Jeffrey Wrana (University of Toronto, Ontario). Luciferase activities were determined with a Dual-Glo luciferase assay kit (Promega) using a Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems). All experiments were performed at least three times.

For transient gene silencing, HaCaT cells were transfected with two distinct siRNAs specifically targeting YAP or TAZ (Sigma-Aldrich human YAP or TAZ Mission siRNAs SASL_Hs01_00182403 and SASI_Hs01_00124479, respectively). The siRNA sequences were different from those from the shRNA lentiviral vectors. Sequence details may be found in (Nallet-Staub et al., 2014). A non-targeting siRNA (Sigma-Aldrich Mission Universal Negative control siRNA #2) was used as control. For experiments requiring RNA or protein extraction, cells were seeded at 2 \times 10⁵ cells/well in six-well plates and transfected 24 hr later in fresh medium containing 1% fetal calf serum (FCS) with siRNA (150 ng/well) using 12 μ l of HiPerfect reagent. Sample processing occurred 48 hr later. Stable TAZ knockdown in melanoma cell lines has been described previously (Nallet-Staub et al., 2014).

Biotinylation of Cell Surface Receptors

Briefly, freshly made sulfo-NHS-SS biotin/HBSS (1 mg/ml; Thermo Scientific) was added to either a monolayer culture in a six-well plate (1 ml) to assess total (T) labeling, or domain-specific receptor expression was determined by sulfo-NHS-SS biotin/HBSS addition to either the apical (0.5 ml) or baso-lateral (1 ml) reservoirs of Transwell dishes. Biotin-bound proteins were pulled down with Streptavidin-agarose and resolved on 10% SDS-PAGE. T β RI and T β RII levels were examined with western blotting. Details may be found in (Yin et al., 2013).

Western Blotting

Whole cell extracts and procedures for western analyses have been described previously (Alexaki et al., 2010; Dennler et al., 2009; Yin et al., 2013). For experiments comparing SMAD3 phosphorylation in response to TGF- β in LD versus HD cultures, cells were seeded at a ratio of 1 to 10 between LD and HD, with cell numbers in HD conditions determined in prior experiments to be sufficient for cell confluency immediately after cell attachment. TGF- β treatment was done 24 hr after cell seeding and proteins extracted 30 min later. Antibody descriptions, references, and dilutions are provided in the Supplemental Experimental Procedures.

Immunofluorescence

Cells grown on poly-lysine-coated coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and permeabilized with 1× PBS, 0.1% Triton X-100, 5% FCS for 1 hr at room temperature then blocked with goat serum. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies raised against SMAD2/3 or TAZ (see Supplemental Experimental Procedures for details). Nuclei were stained with Hoechst 37342 (1:1,000, Sigma-Aldrich). After washing with PBS, appropriate Alexa Fluor (Life Technologies) anti-goat (488), anti-rabbit (555), or anti-mouse (467) fluorescent secondary antibodies (1:1,000) were used for immunofluorescent visualization using either an inverted fluorescent microscope (Leica DM-IRB, Leica Microsystems) equipped with a digital video camera (Princeton Instruments), or with a 100x objective on a Zeiss LSM 510 confocal system. Image capture was performed using MetaMorph software version 7.7 (Molecular Devices). Fluorescence signals were analyzed and images merged using ImageJ software tools.

Statistics

All quantitative data are expressed as mean \pm SD. The p values for experiments were obtained with the Mann-Whitney U-test. Differences between groups were considered significant for p \leq 0.05. **p < 0.01; ***p < 0.001.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and four figures and can be found with this article online at http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.011.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.M. and E.B.L. designed and planned the project, supervised data acquisition, and wrote the manuscript. F.N.S., X.Y., C.G., V.M., S.B.M., and D.J. carried out the experimental work. All authors discussed the results and commented on and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper is dedicated to the memory of Anita B. Roberts, great mentor and friend. Supported by the Donation Henriette et Emile Goutière, Institut National du Cancer (INCa, PLBIO12-020, and MELA13-002), INSERM, CNRS, Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité de la Manche, Equipe Labellisée LIGUE EL-2011AM), Université Paris XI (to A.M.), France-Berkeley Fund (to D.J.), and Public Health Service Grants GM-54200 and GM-55816 from the National Institute of General Medical Sciences and the Mayo Foundation (to E.B.L.). F. N.-S. was the recipient of a Ligue Nationale Contre le Cancer doctoral studentship.

Received: March 19, 2014 Revised: October 9, 2014 Accepted: January 14, 2015 Published: March 9, 2015

REFERENCES

Alarcón, C., Zaromytidou, A.I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., et al. (2009). Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. Cell *139*, 757–769.

Alexaki, V.I., Javelaud, D., and Mauviel, A. (2008). JNK supports survival in melanoma cells by controlling cell cycle arrest and apoptosis. Pigment Cell Melanoma Res *21*, 429–438.

Alexaki, V.I., Javelaud, D., Van Kempen, L.C., Mohammad, K.S., Dennler, S., Luciani, F., Hoek, K.S., Juàrez, P., Goydos, J.S., Fournier, P.J., et al. (2010). GLI2-mediated melanoma invasion and metastasis. J. Natl. Cancer Inst. *102*, 1148–1159.

Beyer, T.A., Weiss, A., Khomchuk, Y., Huang, K., Ogunjimi, A.A., Varelas, X., and Wrana, J.L. (2013). Switch enhancers interpret TGF- β and Hippo signaling to control cell fate in human embryonic stem cells. Cell Rep. 5, 1611–1624.

Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V.B., Wong, E., Orlov, Y.L., Zhang, W., Jiang, J., et al. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. Cell *133*, 1106–1117.

Chen, C.L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *107*, 15810–15815.

Chitilian, J.M., Thillainadesan, G., Manias, J.L., Chang, W.Y., Walker, E., Isovic, M., Stanford, W.L., and Torchia, J. (2014). Critical components of the pluripotency network are targets for the p300/CBP interacting protein (p/CIP) in embryonic stem cells. Stem Cells *32*, 204–215.

Chung, K.Y., Agarwal, A., Uitto, J., and Mauviel, A. (1996). An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. J. Biol. Chem. *271*, 3272–3278.

Daniels, C.E., Wilkes, M.C., Edens, M., Kottom, T.J., Murphy, S.J., Limper, A.H., and Leof, E.B. (2004). Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. J. Clin. Invest. *114*, 1308–1316.

Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S., and Gauthier, J.M. (1998). Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. EMBO J. *17*, 3091–3100.

Dennler, S., André, J., Alexaki, I., Li, A., Magnaldo, T., ten Dijke, P., Wang, X.J., Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2007). Induction of sonic hedgehog mediators by transforming growth factor-beta: Smad3-dependent activation of Gli2 and Gli1 expression in vitro and in vivo. Cancer Res. 67, 6981–6986.

Dennler, S., André, J., Verrecchia, F., and Mauviel, A. (2009). Cloning of the human GLI2 Promoter: transcriptional activation by transforming growth factorbeta via SMAD3/beta-catenin cooperation. J. Biol. Chem. 284, 31523–31531.

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

Ellenrieder, V., Hendler, S.F., Ruhland, C., Boeck, W., Adler, G., and Gress, T.M. (2001). TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. Int. J. Cancer *93*, 204–211.

Ferrigno, O., Lallemand, F., Verrecchia, F., L'Hoste, S., Camonis, J., Atfi, A., and Mauviel, A. (2002). Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. Oncogene *21*, 4879–4884.

Fujii, M., Toyoda, T., Nakanishi, H., Yatabe, Y., Sato, A., Matsudaira, Y., Ito, H., Murakami, H., Kondo, Y., Kondo, E., et al. (2012). TGF- β synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. J. Exp. Med. 209, 479–494.

Gomis, R.R., Alarcón, C., He, W., Wang, Q., Seoane, J., Lash, A., and Massagué, J. (2006). A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *103*, 12747–12752.

Heino, J., and Massagué, J. (1989). Transforming growth factor-beta switches the pattern of integrins expressed in MG-63 human osteosarcoma cells and causes a selective loss of cell adhesion to laminin. J. Biol. Chem. 264, 21806–21811.

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

Ignotz, R.A., Heino, J., and Massagué, J. (1989). Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Regulation of vitronectin receptor and LFA-1. J. Biol. Chem. *264*, 389–392.

Javelaud, D., Mohammad, K.S., McKenna, C.R., Fournier, P., Luciani, F., Niewolna, M., André, J., Delmas, V., Larue, L., Guise, T.A., and Mauviel, A. (2007). Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. Cancer Res. *67*, 2317–2324.

Javelaud, D., Alexaki, V.I., Pierrat, M.J., Hoek, K.S., Dennler, S., Van Kempen, L., Bertolotto, C., Ballotti, R., Saule, S., Delmas, V., and Mauviel, A. (2011a). GLI2 and M-MITF transcription factors control exclusive gene expression programs and inversely regulate invasion in human melanoma cells. Pigment Cell Melanoma Res 24, 932–943.

Javelaud, D., van Kempen, L., Alexaki, V.I., Le Scolan, E., Luo, K., and Mauviel, A. (2011b). Efficient TGF- β /SMAD signaling in human melanoma cells associated with high c-SKI/SnoN expression. Mol. Cancer *10*, 2.

Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordón-Cardo, C., Guise, T.A., and Massagué, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. Cancer Cell 3, 537–549.

Kon, A., Vindevoghel, L., Kouba, D.J., Fujimura, Y., Uitto, J., and Mauviel, A. (1999). Cooperation between SMAD and NF-kappaB in growth factor regulated type VII collagen gene expression. Oncogene *18*, 1837–1844.

Korang, K., Christiano, A.M., Uitto, J., and Mauviel, A. (1995). Differential cytokine modulation of the genes LAMA3, LAMB3, and LAMC2, encoding the constitutive polypeptides, alpha 3, beta 3, and gamma 2, of human laminin 5 in epidermal keratinocytes. FEBS Lett. *368*, 556–558.

Levy, L., and Hill, C.S. (2005). Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor beta (TGF-beta) target genes and distinguishes

TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. Mol. Cell. Biol. 25, 8108–8125.

Massagué, J. (2012). TGF β signalling in context. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13, 616–630.

Mauviel, A., Chen, Y.Q., Dong, W., Evans, C.H., and Uitto, J. (1993). Transcriptional interactions of transforming growth-factor-beta with pro-inflammatory cytokines. Curr. Biol. 3, 822–831.

Mauviel, A., Lapière, J.C., Halcin, C., Evans, C.H., and Uitto, J. (1994). Differential cytokine regulation of type I and type VII collagen gene expression in cultured human dermal fibroblasts. J. Biol. Chem. *269*, 25–28.

Mauviel, A., Chung, K.Y., Agarwal, A., Tamai, K., and Uitto, J. (1996). Cell-specific induction of distinct oncogenes of the Jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expression by transforming growth factor-beta in fibroblasts and keratinocytes. J. Biol. Chem. 271, 10917–10923.

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

Mohammad, K.S., Javelaud, D., Fournier, P.G., Niewolna, M., McKenna, C.R., Peng, X.H., Duong, V., Dunn, L.K., Mauviel, A., and Guise, T.A. (2011). TGFbeta-RI kinase inhibitor SD-208 reduces the development and progression of melanoma bone metastases. Cancer Res. *71*, 175–184.

Murphy, S.J., Doré, J.J., Edens, M., Coffey, R.J., Barnard, J.A., Mitchell, H., Wilkes, M., and Leof, E.B. (2004). Differential trafficking of transforming growth factor-beta receptors and ligand in polarized epithelial cells. Mol. Biol. Cell *15*, 2853–2862.

Murphy, S.J., Shapira, K.E., Henis, Y.I., and Leof, E.B. (2007). A unique element in the cytoplasmic tail of the type II transforming growth factor-beta receptor controls basolateral delivery. Mol. Biol. Cell *18*, 3788–3799.

Nallet-Staub, F., Marsaud, V., Li, L., Gilbert, C., Dodier, S., Bataille, V., Sudol, M., Herlyn, M., and Mauviel, A. (2014). Pro-invasive activity of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ in cutaneous melanoma. J. Invest. Dermatol. *134*, 123–132.

Nicolás, F.J., and Hill, C.S. (2003). Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. Oncogene *22*, 3698–3711.

Oh, H., and Irvine, K.D. (2011). Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through bantam. Dev. Cell *20*, 109–122.

Overall, C.M., Wrana, J.L., and Sodek, J. (1989). Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. J. Biol. Chem. *264*, 1860–1869.

Redini, F., Daireaux, M., Mauviel, A., Galera, P., Loyau, G., and Pujol, J.P. (1991). Characterization of proteoglycans synthesized by rabbit articular chondrocytes in response to transforming growth factor-beta (TGF-beta). Biochim. Biophys. Acta *1093*, 196–206.

Reynisdóttir, I., Polyak, K., lavarone, A., and Massagué, J. (1995). Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGFbeta. Genes Dev. 9, 1831–1845.

Robinson, B.S., Huang, J., Hong, Y., and Moberg, K.H. (2010). Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in Drosophila via the FERM-domain protein Expanded. Curr. Biol. *20*, 582–590.

Rodeck, U., Nishiyama, T., and Mauviel, A. (1999). Independent regulation of growth and SMAD-mediated transcription by transforming growth factor beta in human melanoma cells. Cancer Res. *59*, 547–550.

Snodgrass, S.M., Cihil, K.M., Cornuet, P.K., Myerburg, M.M., and Swiatecka-Urban, A. (2013). Tgf-beta1 inhibits cftr biogenesis and prevents functional rescue of Δ f508-cftr in primary differentiated human bronchial epithelial cells. PLoS One 8, e63167.

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

Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., and Wrana, J.L. (2010). The Crumbs complex

couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. Dev. Cell 19, 831–844.

Wrana, J.L., Maeno, M., Hawrylyshyn, B., Yao, K.L., Domenicucci, C., and Sodek, J. (1988). Differential effects of transforming growth factor-beta on the synthesis of extracellular matrix proteins by normal fetal rat calvarial bone cell populations. J. Cell Biol. *106*, 915–924.

Wrana, J.L., Overall, C.M., and Sodek, J. (1991). Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. Eur. J. Biochem. *197*, 519–528.

Yakovich, A.J., Huang, Q., Du, J., Jiang, B., and Barnard, J.A. (2010). Vectorial TGFbeta signaling in polarized intestinal epithelial cells. J Cell Physiol 224, 398–404.

Yin, J.J., Selander, K., Chirgwin, J.M., Dallas, M., Grubbs, B.G., Wieser, R., Massagué, J., Mundy, G.R., and Guise, T.A. (1999). TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. J. Clin. Invest. *103*, 197–206.

Yin, X., Murphy, S.J., Wilkes, M.C., Ji, Y., and Leof, E.B. (2013). Retromer maintains basolateral distribution of the type II TGF- β receptor via the recycling endosome. Mol. Biol. Cell 24, 2285–2298.

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

Zhao, B., Li, L., Lei, Q., and Guan, K.L. (2010). The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. Genes Dev. 24, 862–874.

Article II

Establishment of apico-basal polarity in epithelial cells: implication for their resistance to apical TGF-ß and role of ZO-1

Saber Ben Mimoun, Véronique Marsaud, Cristèle Gilbert and Alain Mauviel.

En cours de finalisation

Résumé :

L'établissement de la polarité apico-basale est une caractéristique clé des cellules épithéliales et essentielle pour leurs fonctions au sein des organes. Ce processus implique la formation et le maintien des jonctions serrées qui sont nécessaires pour assurer la fonction de barrière en réduisant la perméabilité paracellulaire, et la fonction de clôture en séparant la membrane en deux domaines : un domaine apical et un domaine basolatéral.

Nous avons démontré lors de notre dernière étude que la polarité apico-basale est capable de moduler l'activation de la voie du TGF-ß dans les cellules épithéliales polarisées. En effet, la formation d'un épithélium étanche aux ions et au macromolécules empêche le ligand TGF-ß, secrété au niveau apical, d'accéder à ses récepteurs retenus au niveau basolatéral de la membrane plasmique (Nallet-Staub et al., 2015).

Dans ce travail, nous avons d'abord caractérisé les paramètres biophysiques liés à la fonction barrière de plusieurs lignées épithéliales. Ensuite, en utilisant des cellules EpH4 (cellules mammaires murines immortalisées), nous avons analysé le rôle de la protéine des jonction serrée Zona Occludens 1 (ZO-1) dans le processus de polarisation et dans la résistance des cellules polarisées à l'induction apicale au TGF-ß.
Ainsi, nous montrons que la mesure de la perméabilité transépithéliale (TER) pourrait être utilisée comme un outil pour vérifier la polarité de l'épithélium à travers l'évaluation de sa fonction de barrière. Malgré ce qui est suggéré dans la littérature, nous démontrons également qu'une longue exposition au TGF-ß et l'irradiation aux rayons X des cellules EpH4 polarisées, ne modifient pas la localisation de ZO-1 ou l'établissement de la polarité apicobasale. Enfin, nous montrons que ZO-1 n'est pas nécessaire à l'établissement des fonctions de barrière et de clôture des jonctions serrées dans les cellules EpH4 polarisées. Ainsi, nous concluons que ZO-1 n'est pas un bon marqueur pour évaluer la polarité des cellules épithéliales, et qu'il n'est pas requis pour leur résistance au TGF-ß apical.

Establishment of apico-basal polarity in epithelial cells: implication for their resistance to apical TGF-ß and role of ZO-1

Saber Ben Mimoun, Véronique Marsaud, Cristele Gilbert and Alain Mauviel*

Team "TGF-ß and Oncogenesis", Institut Curie, Equipe Labellisée LIGUE 2016, INSERM U1021/CNRS UMR3347, Université Paris-Sud, F91400, Orsay, FRANCE Corresponding author: **alain.mauviel@curie.fr**

IN PREPARATION

ABSTRACT

Etablishment of apico-basal polarity is a key feature of epithelial cells and essential to theirs functions and responsiveness to signaling pathways such as the TGF-ß pathway. The development of this polarity involves the formation and the maintenance of tight junctions. Herein, we characterize the biophysical parameters related to the barrier function of several epithelial cell lines. Using EpH4 cells, we also analyzed the role of the tight junction protein Zonula Occludens 1 (ZO-1) in this polarization process and in the resistance to apical TGF-ß signaling. We show that the measurement of Trans-epithelial permeability (TER) could be used as a tool to verify the polarity of epithelia through the assessment of their barrier function. Despite what is suggested in the literature, we also demonstrate that, long exposure to TGF-ß and X-ray irradiation of fully polarized EpH4 cells, do not alter ZO-1 localization or the establishment of apico-basal polarity. Finally, we show that ZO-1 is not required for either the Tjs barrier or the fence functions in polarized EpH4 cells. Thus, we conclude that ZO-1 is not a good marker of fully polarized epithelial cells and is not essential for their resistance to apical TGF-ß.

KEYWORDS : TGF-ß, apico-basal polarity, ZO-1, epithelial cells

Introduction

TGF-ß is a pleotropic cytokine involved in many physiological processes, from embryonic development to homeostasis in adult tissues. It is a key player in pathologies like fibrosis and cancer where it plays both a role of tumor suppressor and oncogene depending on the stage of tumor development (REFS). TGF-ß has been shown to induce tumor progression by inhibiting apoptosis, helping cancer cells escape the immune system and inducing an epithelial to mesenchymal transition (EMT), a key step toward tumor cell invasiveness, and metastasis. This biological process leads to the transdifferentiation of epithelial cells into motile mesenchymal cells. During the EMT process, epithelial cells lose their intercellular junctions and their attachment to the basement membrane, leading to a loss of apical-basal polarity and disruption the epithelium and a gain of motility (Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006). These changes may also have consequences on signal transduction mechanisms, asw e recently demonstrated that polarized epithelial cells are resistant to apical TGF-ß signaling. Specifically, we found that at low density, TGF-ß receptors are located in the cytoplasmic membrane all around the cell, while in polarized cells, receptors are sequestered at their basolateral domain. As the establishment of baso-apical polarity renders the epithelium non-permeable to macromolecules, it consequently prevents apically delivered TGF-ß from activating its receptors that are exclusively located on the basolateral compartments of polarized epithelial cells (Murphy et al., 2004; Nallet-Staub et al., 2015; Vermeer et al., 2003).

The partition of the cytoplasmic membranes into two heterogeneous domains and the control of the epithelial permeability upon polarization is due to the establishment of cell-cell junctions. In addition to the establishment of adherence junctions also present between non-polarized cells, polarized epithelial cells establish a particular type of junctions called Tight Junctions (TJs). Many proteins are involved in these junctions, some are integrated in the membrane like Claudin and Occludin and others are cytoplasmic like the Zonula Occludens protein family (ZO-1, ZO-2, ZO-3), also called tight junctions MAGUKs (CA VEUT DIRE?). ZO-1 was the first identified constituent of TJs (Stevenson et al., 1986). It has been described as a key protein in the establishment and the integrity of tight junctions.

Herein, we studied the apico-basal polarization of several epithelial cells by analyzing biophysical parameters related to their barrier function. Para-cellular permeability of each epithelium, used as a surrogate for the establishment of baso-apical polarity, was assessed by measuring their permeability to ions and macromolecules. We also examined the effect of long exposure to TGF-ß, and X-ray irradiation on the localization of TJs protein ZO-1 and on the TJs barrier function of fully polarized EpH4 cells. We later knocked down ZO-1 in three EpH4 clones in order to study its role in the TJs barrier and fence functions upon apico-basal polarization. Our results show that long exposure to TGF-ß and X-ray irradiation of fully polarized EpH4 cells, do not alter ZO-1 localization or the establishment of apico-basal polarity. We also demonstrate that ZO-1 is not required for both Tjs functions in polarized EpH4 cells. Thus, we conclude that ZO-1 is not a good marker of fully polarized epithelial cells and is not essential for their resistance to apical TGF-ß.

Materials and Methods

Cell culture

EpH4 (immortalized mouse mammary epithelial cells), T84 (human colon carcinoma cells), MDCKI (Madin-Darby Canine Kidney type I cells), MDCKII (Madin-Darby Canine Kidney Type II cells) and HaCat (Human immortalized keratinocytes) cells were cultured at 37°C with 5% CO2 in DMEM (4,5g/l glucose) supplemented with 10% fetal bovine serum and a mixture of Penicillin (10 000 u/mL) and Streptomycin (10 000 ug/mL). For experiments on monolayer cultures, cells were plated at $1.2x10^6$ cells in 6-well dishes or proportionally according to dish surface. For Transwell cultures (12 mm Corning Transwell with 0.4 µm pores), cells were plated at a density of 2,5 10^5 cells/ml in 0.5 ml of culture medium and grown for 4 days prior to experiments. Fully polarized monolayers of EpH4, MDCKI & II, T84 cells were obtained after 4 days, as verified by serial measurements of trans-epithelial resistance with a Millipore Millicell-ERS device.

Trans-Epithelial Resistance Assay (TER)

TER was measured directly by emerging the electrodes of an Ohmmeter (Millicell-ERS, Millipore) in the culture medium of each chamber of the Transwell insert. For each epithelium, TER values were calculated by subtracting that of an empty insert and multiplying by the surface of the porous membrane. All measurements were conducted in triplicates after the samples had reached room temperature.

FITC-Dextran Assay

In the FITC-Dextran assays, FITC-Dextran (4, 20 or 40 KDa) was added to the culture medium in the apical compartment of the cell culture inserts (12 mm Corning Transwell with 0.4 μ m pore) at a concentration of 1 mg/ml. At each measurement, a 50 μ l aliquot is collected from the basal compartment after homogenization and placed in a 96-well plate (Berthold 23302). The amount of FITC-Dextran contained in the aliquot is then measured on a Fluorometer (Berthold Mithras LB 940) at an excitation wavelength of of 493nm and an emission wavelength of 517nm. The samples were protected from direct exposition to light and the cell cultures were returned to the incubator at 37 ° C between each measurement. All measurements were conducted in triplicates.

Immunofluorescence

Cells grown, on poly-lysine-coated coverslips (Millipore EZ Slide, 0,7cm2/well) or on inserts (Corning Transwell with 0.4 µm pore and 12 mm polycarbonate membrane), were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and permeabilized with 1x PBS, 0.2% Triton X-100, for 30min at room temperature then blocked with 1x PBS, 0.2% BSA, 5% goat serum for 1h at room temperature. Cells were then incubated overnight at 4C with primary antibodies raised against SMAD2/3 (1/200, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), ZO-1 (1/100, Life Technology, Rockford, IL, USA), ZO-2 (1/100, Life Technology, Rockford, IL, USA). After washing with PBS, appropriate Alexa Fluor (Life Technologies, Eugene, OR, USA) anti-rabbit (488, Life Technologies Eugene, OR, USA) fluorescent secondary antibodies (1:1,000) were diluted in the blocking

buffer and added to samples. Before incubation for 2h at room temperature, nuclei were stained by adding Hoechst 37342 (1:1,000, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For immunofluorescent visualization we used a SP5 Leica confocal system. Image capture was performed using Leica Application Suite software version 2.7.3.9723 (Molecular Devices). Fluorescence signals were analyzed and images merged using ImageJ software tools.

Western blot analysis

EpH4 cells were seeded at $2,5x10^5$ or at $1x10^6$ per well on 12 well inserts (Corning Transwell with 0.4 µm pore and 12 mm polyester membrane) or 6 well plates (TPP), repectevely. Cells were then cultured for 4 days, with or without TGF-ß ligand for 2h, prior to cell lysis. Total protein from the EpH4 cells was isolated using RIPA lysis buffer (150mM NaCL, 50mM Tris-HCL pH=7.4, 1% Triton, 0.25 % DOC, 1mM EDTA) containing a cocktail of protease inhibitors (PhosStop, Roche, Basel, Switzerland). Primary antibodies included: ZO-1 (1/100, Invitrogen, Rockford, IL, USA), Smad2/3 (1/50 000, courtesy of Dr. Ed Leof, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA), ZO-2 (1/100, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), UKHC (1/1000, Bethyl, Montgomery, TX, USA).

shRNA-mediated silencing of human ZO-1 in EpH4 cells

Mouse ZO-1 shRNA Lentiviral Particles and Control shRNA Lentiviral Particles were purchased from Sigma-Aldrich. Inc, Darmstadt, Germany. EpH4 cells were seeded in 24 well plates (TPP, Trasadingen, Switzerland) at 6x10⁴ cell/well. After reaching 60% confluency, cells were transduced with 5 different shRNA sequences according to the manufacturer's protocol for Mission[™] Lentiviral Transduction Particles products, with an MOI of 2. After puromycin selection, five distinct stable cell populations (sh1, sh2, sh3, sh4 and sh5), were analyzed by immunofluorescence against ZO-1. The sh1, sh4 and sh5 were selected based on the higher knock down of ZO-1. To avoid clonal variation, we randomly pooled individual infectants for each stable cell line produced by infection. Three individual clones validated for ZO-1 knockdown by ZO-1 immunofluorescence (sh1-clone3, sh4-clone6 and sh5-clone4) were selected for subsequent TGF-ß and I.R. studies.

Ionizing radiations

Cells were irradiated 4 days post-plating using the X-RAD 320 Dx (Precision X-Ray Inc., North Branford, Connecticut, USA) with a total dose of 2 Gy : 200 Kv, 20 mA, beam-conditioning filter (0,3 mm Cu + 1 mm AI), distance from source 60cm, time 98 sec. Control plates were sham irradiated.

Results

Epithelial cells biophysical parameters during apico-basal polarity establishment

In order to study the establishment of epithelia and of apico-basal polarity, we assessed the barrier function of the epithelium, through the measurement of the paracellular permeability for ions by measuring Trans-epithelial Resistance (TER) with an Ohmmeter, and that of trans-epithelial transport of macromolecules using the epithelial permeability FITC-Dextran method. Several epithelial cell lines were compared, namely EpH4 (immortalized mouse mammary epithelial cells), T84 (human colon carcinoma cells), MDCKI (Madin-Darby Canine Kidney type I cells), MDCKII (Madin-Darby Canine Kidney type I cells), and HaCat cells (Human immortalized keratinocytes). The first four cell lines are known to establish apicobasal polarity when cultured at high density. HaCat in the other hand do not polarize (Kirschner and Brandner, 2012).

First, the barrier function of TJs was examined for all these cell lines grown to confluency on Transwell[™] inserts in order to mimic at best the in vivo-like conditions (Zegers et al., 2003).The TER assay distinguishes two groups of cell lines (Fig.1A). The first group includes HaCat and MDCKII cells which both exhibit a very low TER, around 120 Ohmcm², even after several days post-confluency. The second group includes EpH4, T84 and MDCKI cells, with a TER that increased dramatically along with the establishment of polarity, to reach maximal values between 4000 and 7000 Ohmcm². When assessing the permeability for large molecules after 4 days in culture on Transwell[™] inserts, (Fig. 1B) HaCat cells were single out from the other cell lines, with values around 160 000, 120 000 and 40 000 a.u for FITC-Dextran 4, 20 and 40KDa, respectively., while all the other cell lines have very low fluorescence values (around 2000 a.u), corresponding to an almost complete absence of passage of macromolecules across these epithelia.

These results suggest that confluent EpH4, T84, MDCKI and MDCKII cells establish epithelia with a functional TJs barrier for macromolecules (4, 20 and 40 KDa), while HaCat cells do not. Also, unlike the other epithelial cells, MDCKII cells form a leaky epithelium for ions, with values similar to those observed with non-polarized HaCat cells.

Based on the correlations between the TER and FITC-Dextran method results, the TER assay seems to be an adequate mean to follow the establishment of apicobasal polarity for EpH4, T84 and MDCKI cell lines but not the MDCKII cell line. In the following experiments, apico-basal polarity in EpH4 cells was studied after 4 days in culture, corresponding to maximal TER values.

Calcium depletion causes the destruction of intercellular junctions and the alteration of the barrier function of polarized epithelial cells

To further characterize the establishment of apico-basal polarity, we then wanted to study the effect of the destruction of intercellular junctions on the barrier function of epithelia after calcium depletion. Ca++ is essential for the formation of adherens junsctons and depletion of Ca²⁺ ions from epithelial cell cultures has been shown to

result in the rapid destruction of intercellular junctions, including TJs (Gonzalez-Mariscal et al., 1990; Zheng and Cantley, 2007).

EpH4, T84, MDCKII and HaCat cells were grown for 4 days on inserts and TER and FITC-Dextran permeability values were measured 2 hours later, without or with calcium depletion. Ca²⁺ depletion significantly decreases the TER (around 4000 fold) and dramatically increases the 4, 20 and 40KDa FITC-Dextran passage through the epithelia (more than 80 000 fold) formed by EpH4 and T84 cells. No difference was observed for the values of TER or for the different FITC-Dextran used in the case of HaCat cells, which already have very high permeability for both ions and macromolecules. Likewise, calcium depletion had no impact on the already very low TER of MDCKII cells, but significantly increased the permeability to FITC-Dextran of any m.w. (more than 40 000 fold).

The TJs protein ZO-1 is localized to the cytoplasmic membrane in polarized epithelial cells

To visualize intercellular junctions, we next examined the localization of the TJs protein ZO-1 in three cell lines, EpH4 and MDCKII cells that exhibit high TER and low FITC-Dextran), and HaCat cells (low TER and high FITC-Dextran). ZO-1 staining is continuous and fully underlines the cytoplasmic membrane in EpH4 and MDCK II epithelial cells, while being discontinuous at the cell membrane and diffuse in the cytoplasm in confluent HaCat cells. As expected, Ca^{++} depletion altered the localization of ZO-1 in EpH4 and MDCK II epithelia but not in HaCat epithelia. Specifically, 2h after Ca²⁺ elimination, ZO-1 diffuses to the cytoplasm of EpH4 and MDCKII epithelia, similar to what is observed in HaCat cells even in the presence of Ca⁺⁺.

When cross-analyzed with the TER and FITC-Dextran method data, these results suggest a correlation between epithelial permeability and ZO-1 localization: the restricted permeability of EpH4, MDCK II and T84 epithelia is associated with exclusively membranous ZO-1 staining, while the leaky HaCat epithelium is associated with diffuse cytoplasmic ZO-1 localization. As expected, these results show a correlation between the membrane localization of ZO-1 and the formation of functional TJs barrier in polarized epithelial cells. Nonetheless, this does not mean that ZO-1 is required for the for the barrier function.

Effects of long-term TGF-ß treatment combined with therapeutic doses of X-Ray radiation on ZO-1 localization and epithelial biophysical parameters of EpH4 cells

To further study the role of ZO-1 and tight junctions in general in the establishment and the maintain of a functional polarized epithelium. Instead of destroying all intercellular junctions, achieved by calcium depletion, we wanted to only alter the tight junction functions and specifically throw altering ZO-1 localization. For that we used two technics: Long exposure to basal TGF-ß and X-Ray ionizing radiation, both known to alter TJs structure and function.

Before the **long induction with basal TGF-ß**, EpH4 cells were grown on inserts for 4 days. The TER of each simple has been measured to ensure a functional TJs barrier, and then TGF-ß was added at the basal chamber from day 5 until day 8.

ZO-1 indirect immunofluorescence staining shows identical membrane localization for both treated and untreated polarized EpH4 cells (Fig. 3A). While the TER of untreated EpH4 cells continued to increase reaching a plateau around 7000 Ohm.cm², the basal induction with TGF-b at day 5 caused a slight decrease of the TER of treated cells followed by a plateau around 3500 Ohm.cm² (Fig. 3B). However, it is important to point out that the TER of treated cells is still significantly higher than the TER of HaCat cells: 3500 compared to 150 Ohm.cm². Furthermore, the FITC-Dextran assay show no difference regarding the flux of 20 KDa molecules between the treated and untreated cells (Fig. 3C). The later are lower by 100,000 fold compared to HaCat cells. This means that long exposure to basal TGF-ß does not alter ZO-1 localization and the barrier function for large solutes like the 20 KDa FITC-Dextran, which is smaller than the TGF-ß ligand (25KDa).

The ZO-1 immunofluorescence results show that **X-Ray irradiation** at 2Gy does not alter ZO-1 localization in polarized EpH4 epithelium; ZO-1 signal remains continuously located at the cytoplasmic membrane (Fig.4A). The apical treatment with TGF-ß of the previously irradiated polarized EpH4 cells, do not induce Smad2/3 nuclear localization (Fig.4B). Non irradiated low density EpH4 cells are used as a control and show a nuclear translocation of Smad2/3 proteins after apical stimulation with TGF-ß. We conclude that neither irradiation at 2Gy nor long exposure to basal TGF-ß are sufficient to alter the localization of ZO-1 and the barrier function of TJs in EpH4 cells.

Effect of ZO-1 depletion on epithelial permeability and TGF-ß signaling of polarized EpH4 cells

In order to specifically study the role of ZO-1 in the apico-basal polarization and in the regulating the TGF-ß signaling in polarized epithelial cells, we used wild type EpH4 cells, and established three clonal cell lines of EpH4 stably knocked down for ZO-1 by expressing shRNA. Here, the parental EpH4 and the ZO-1-deficient are referred as to EpH4 wt and sh1-3, sh4-6 and sh5-4, respectively. The results of, both immunofluorescence (Fig. 5A) and western blot (Fig. 5B), show that ZO-1 protein has been successfully and effectively knocked down in the three clones. No significant difference was observed in the expression of ZO-2 (Supplementary figure 1).

We then used the generated EpH4 clones to study the effect of ZO-1 depletion on the barrier function of a polarized epithelium of EpH4 cells. EpH4 cells were seeded and cultured on inserts in order to establish a polarized epithelium. At day 4, the permeability of the established epithelium to ions and macromolecules was compared between the EpH4 wt and the clones by performing the TER and the FITC-Dextran assays.

The TER assay show that epithelia established from the EpH4 clones lacking the expression of ZO-1 have the same values of TER as the EpH4 wt (Fig. 5C). Like EpH4 wt, all 3 clones have a high TER (equal or above 3000 Ohm), which means that the epithelium does not allow the passage of ions from the apical to the basal side. Similarly, the epithelia established from EpH4 clones have a very low level of FITC-Dextran 20KDa at the basal chamber compared to non polarized HaCat epithelium. This means that the epithelia established from EpH4 clones are impervious to the 20 KDa FITC-Dextran (Fig. 5D). These results show that the depletion of ZO-1 does not alter the permeability of polarized EpH4 epithelium for

both ions and 20KDa molecules. This suggests that ZO-1 is not required for the barrier function of EpH4 polarized epithelium.

We previously showed that the depletion of ZO-1 does not affect the barrier function of TJs, which is a key element reagrding the resistance of polarized epithelial cells to apical TGF-ß. To confirm the later results and to study any possible effect of ZO-1 depletion on the TGF-ß signaling in the context of polarized EpH4 epithelium, we used two strategies based on the use of EpH4 cells cultured either in monolayers on porous membranes (inserts).

The results of westernblots from fthe monolayer cultures show that EpH4 clones show a similaire P-Smad2/3 signal as wild type EpH4. When TGF-ß is added apically, the induction of the phosphorylation of Smad2/3 is only detected in the case of a calcium depletion (Fig. 5E). When cultured on inserts, no P-Smad2/2 signal was detected when TGF-b was added to the apical chmaber for both wild type and the three EpH4 mutants lacking ZO-1. A strong P-Smad2/3 signal is detected when wild type and EpH4 mutants were induced basolaterally with TGF-ß (Fig. 5F). The depletion of ZO-1 does not alter the resistance of polarized EpH4 cells to apical TGF-ß, which is coherent with the study of the barrier function of TJs in the mutant EpH4 cells lacking ZO-1 compared to the wild type EpH4.

Discussion

Unlike other cell types, epithelial cells are able to establish apico-basal polarity when cultured at high density and this process has been shown to impact cell signaling. In the case of TGF-ß pathway, when polarized, epithelial cells become resistant to apical TGF-ß (Nallet-Staub et al., 2015). This resistance is essentially due to the partition of the cytoplasmic membranes into two heterogeneous domains and the control of the epithelial permeability upon the establishment of tight junctions, preventing the interaction between the TGF-ß ligand and its receptors. The alteration of either one of these two characteristics could change the impact of apico-basal polarity on TGF-ß signaling.

Our first aim was to characterize the barrier function of tight junctions of several epithelial cell lines by measuring the paracellular permeability and determining ZO-1 localization. Our results show that four days of cell culture were sufficient for EpH4, T84, MDCK I and MDCK II to establish stable and fully functional TJs barrier against large molecules (4,20, and 40 KDa). This was correlated, except for MDCKII, with a spike of the TER values, which indicates a significant restriction of ions diffusion through the different epitheliums. ZO-1 was located at the membrane in all cell lines except HaCat, which was also the only one to keep a high permeability to both ions and macromolecules even after 10 days of cell culture. This is coherent with the fact that HaCat cells do not become resistant to apical TGF-ß when cultured at high density (Nallet-Staub et al., 2015). Based on these results, we conclude that not all epithelial cell lines restrict their paracellular permeability when cultured at high density defining two types of epithelia : leaky epithelia (HaCat) and tight epithelia (EpH4, T84, MDCKI), with the exception of MDCKII which is both leaky for ions and tight for macromolecules. For tight epithelia, the measurement of TER is reliable and non-invasive tool to assess the barrier function of newly formed epithelia, which is a major characteristic of their establishment of apico-basal polarity.

We later wanted to alter the tight junctions functions without destroying all intercellular junction like in the case of calcium depletion. For this we used two technics: long exposure to TGF-ß and X-Ray ionizing radiation, both found to alter TJs structure and function by inducing the epithelial to mesenchymal transition (EMT) (Andarawewa et al., 2007; Valcourt et al., 2005; Xu et al., 2009). Our results show that the long induction of polarized epithelmial cells by TGF-ß did not alter the expression nor the localization of ZO-1. Although unexpected, our observations are coherent with the study done by Brown et al who demonstrated that the induction of EMT by TGF-ß is a rare event in vitro. The study showed that EpH4 cells, among other epithelial cell lines, did not exhibit any changes in cell morphology or reolocalization of ZO-1 after treatment with TGF-ß (Brown et al., 2004). Similarly, the irradiation of fully polarized EpH4 epithelia with a total dose of 2 Gy did not alter their barrier function and their resistance to apical TGF-B. Our results are in odds with those obtained by Andarawewa et al. showing that irradiated HMEC cells with 2, 4 and 6 Gy, decreases the expression of ZO-1, which dramatically sensitized them to undergo TGFβ-induced EMT (Andarawewa et al., 2007). These observed differences could be due to the timing of irradiation: while in the other study irradiation has been done shortly after cell attachment, we only irradiate fully polarized epithelia.

Finally we examined the role of ZO-1 in apico-basal polarity and in the resistance of polarized cells to apical TGF-ß using three EpH4 clones knocked down for ZO-1. We first demonstrated that ZO-1 has been completely depleted in our three EpH4 clones, without affecting the expression and the membrane localization of ZO-2 (SX). The assessment of the barrier function showed a slight increase in the permeability to ions in the three mutants compared to the wild type, but no difference has been observed for 20KDa molecules. As expected, the three clones lacking ZO-1 resited to apical induction with TGF-ß, which means that thanks to the fence function of Tis, TGF-ß receptors are still retained in the basolateral domain of the membrane. Thus we conclude that ZO-1 is not required for both the barrier and the fence functions of TJs and consequently for resistance of polarized epithelial cells to apical TGF-ß. Despite the correlation between its membrane localization and the formation of functional TJs barrier, ZO-1 should not be used as the only marker for assessing the formation of functional TJs and the establishment of apico-basla polarity. This lack of effect of the depletion of ZO-1 could be due to a functional compensation by its paralog ZO-2. As already mentioned, redundancy with ZO-3 is not possible since it's not expressed in EpH4 cells (Umeda et al., 2004). Thus, the generation of EpH4 clones lacking either ZO-2 or both ZO-1 and ZO-2 is required to further investigate the functional redundancy between these two TJs proteins.

Figure 1: Comparative analysis of Trans-epithelial permeability in EpH4, T84, MDCK II and HaCat epithelial cell lines. A: Trans-Epithelial Resistance (TER). EpH4, T84, MDCKI, MDCK II and HaCat cells ells were plated on 12mm filters and cultured for 10 days with daily TER measurements using an Ohm-meter. TER values were calculated by subtracting the TER of an empty Transwell, and are the average of three independent measurements per condition. B: Epithelial permeability to macromolecules. EpH4, T84, MDCK II and HaCat cells were cultured for 4 days on Transwell[™] chambers. All measurements were performed in triplicates 2h after adding the 4, 20 or 40 kDa FITC-Dextran to the apical chamber. C: Effect of calcium depletion on the TER of confluent epithelial cell cultures. EpH4, T84, MDCK II and HaCat cells were seeded on Transwells (polyester, 12mm) at 2,5x10⁵ cell/well, the cultured for 4 days. TER was measured after 2h of calcium depletion. D: Effect of calcium depletion on epithelial permeability to macromolecules. EpH4, T84, MDCKII and HaCat cells were cultured for 4 days. TER was measured after 2h of calcium depletion. D: Effect of calcium depletion on epithelial permeability to macromolecules. EpH4, T84, MDCKII and HaCat cells were cultured for 4 days on transwell chambers. Permeability to 4, 20 and 40 kDA FITC-Dextran was measured as in panel B.

Figure 2: ZO-1 localization in confluent EpH4, MDCK II and HaCat epithelial sheets - Effect of calcium depletion. For the detection of ZO-1 by indirect immunofluorescence, cells were seeded on Transwells (Millipore EZ Slide, 0,7cm2/well) at $1x10^5$ cell/well, then cultured for 4 days. Medium was changed 2h before fixation and staining for fresh medium with or without Ca⁺⁺. Cells were counterstained with Hoechst to visualize nuclei. Experiments were repeated at least three times. Representative fields are shown.

Figure 3: Effect of a basal-lateral delivery of TGF-ß on ZO-1 localization and epithelial permeability of confluent EpH4 cultures.

EpH4 cells, were seeded on Transwell[™] dishes (polycarbonate, 12mm) at 2,5.10⁵ cell/well, cultured for 4 days and then treated for 4 days with TGF-ß delivered basolaterally. **A**: ZO-1 was detected by indirect immunofluorescence (Magnification X40) at the end of the 4-day period. **B**: Trans-epithelial resistance (TER) was measured every day for 10 days in parallel dishes. **C**: permeability of EpH4 epithelium to 20 KDa FITC-Dextran molecules. Cells were plated on transwells (polyester, 12mm) and then either cultured for 1 day and then treated for 4 days with basal TGF-ß, or cultured for 4 days and then treated for 4 days with basal TGF-ß. Then 20 KDa FITC-Dextran was added to the apical chamber and measurments were done on aliquots from the basal chamber.

Figure 4: Effect of X-ray irradiation on ZO-1 localization and response of a polarized EpH4 epithelium to apically delivered TGF-ß. A: Eph4 cells were seeded on TranswellTM dishes at $2,5x10^5$ cell/well, grown 4 days to allow polarization, then irradiated with 2Gy X-Ray. 48 hours later, cells were fixed and ZO-1 was detected by indirect immunofluorescence. B: Cells were seeded at $2,5.10^5$ cell/well into Transwell (polycarbonate, 12mm) at $2,5.10^5$ cell/well, then irradiated with 2Gy X-Ray at after the establishment of apico-basal polarization. After 48 hours, cells were treated or not with apical TGF-ß (5ng/mL) for 2 hours before cell fixation and staining.

Figure 5 : Effect of ZO-1 knockdown on TGF-ß signaling in EpH4 cells.

Eph4 cells were infected with lentivirus expressing ZO-1 short hairpin RNA (shZO-1) or control lentivirus (shCTL). Several clones were isolated from stable populations and screen for ZO-1 content by indirect immunofluorescence (**A**) and Western blotting (**B**). TER was measured every day after plating in Transwell[™] dishes (**C**) and epithelial permeability to 20-kDa FITC-Dextran was measured after 4 days in cultures (**D**), as described in the legend for Fig. 1. **E:** Effect of Ca⁺⁺ depletion on Smad3 phosphorylation in response to apically-delivered TGF-ß in confluent monolayer cultures of ZO-1 knockdown EpH4 cell clones. Cells were seeded at 1,2x10⁶ cell/well in a 6 well plate (TPP) and cultured for 4 days to allow full polarization of the epithelia. Medium was changed for fresh medium with or without Ca⁺⁺ and treated or not with TGF-ß (5ng/mL) for 2 hours. P-Smad2/3 were determined by Western blotting. **F:** ZO-1 knockdown EpH4 cell clones were allowed to polarize after 4 days of culture on transwell filters. P-SMAD3 levels were measured following a 2-h stimulation with TGF-ß (5ng/mL) added either in the apical or the baso-lateral chamber of the Transwell[™].

Supplementary figure 1: Effect of ZO-1 knockdown on ZO-2 expression and localization in EpH4 cells. ZO-1 and ZO-2 indirect immunofluorescence in EpH4 cells (Magnification X40). EpH4 cells, wt and clones knocked down for ZO-1, were seeded on transwells () at 2,5.10⁵ cell/well, then cultured for 4 days.

Acknowledgments

This work was supported by by grants from Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée LIGUE-2016), Institut National du Cancer (INCa MELA13-002), INSERM, CNRS, Institut Curie, Université Paris-Sud and Donation Henriette et Emile Goutière, (to AM). SBM was recipient of a PhD contract from the Ministry of Higher Education, Research and Innovation (France), and an extension granted by Institut Curie. We thank Delphine Javelaud for critical reading of the manuscript, Pr. Ed Leof (mayo Clinic, Rochester, MN) for supplying us with TGF-ß ligand and Smad2/3 primary antibodies, and the Imaging facility at Institut Curie (Orsay site) for technical support.

References

Andarawewa, K.L., Erickson, A.C., Chou, W.S., Costes, S.V., Gascard, P., Mott, J.D., Bissell, M.J., and Barcellos-Hoff, M.H. (2007). Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition. Cancer research *67*, 8662-8670.
Brown, K.A., Aakre, M.E., Gorska, A.E., Price, J.O., Eltom, S.E., Pietenpol, J.A., and Moses, H.L. (2004). Induction by transforming growth factor-beta1 of epithelial to mesenchymal transition is a rare event in vitro. Breast cancer research : BCR *6*, R215-231.

Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R.G., Bolivar, J.J., Ponce, A., Chavez De Ramirez, B., and Cereijido, M. (1990). Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. The American journal of physiology *259*, C978-986.

Kirschner, N., and Brandner, J.M. (2012). Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. Annals of the New York Academy of Sciences *1257*, 158-166.

Murphy, S.J., Dore, J.J., Edens, M., Coffey, R.J., Barnard, J.A., Mitchell, H., Wilkes, M., and Leof, E.B. (2004). Differential trafficking of transforming growth factor-beta receptors and ligand in polarized epithelial cells. Mol Biol Cell *15*, 2853-2862. Nallet-Staub, F., Yin, X., Gilbert, C., Marsaud, V., Ben Mimoun, S., Javelaud, D., Leof, E.B., and Mauviel, A. (2015). Cell density sensing alters TGF-beta signaling in a cell-type-specific manner, independent from Hippo pathway activation. Developmental cell *32*, 640-651.

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. The Journal of cell biology *103*, 755-766.

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelialmesenchymal transitions in development and disease. Cell *139*, 871-890. Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-

mesenchymal transitions. Nature reviews Molecular cell biology *7*, 131-142. Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. The Journal of biological chemistry *279*, 44785-44794. Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2005). TGFbeta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. Mol Biol Cell *16*, 1987-2002.

Vermeer, P.D., Einwalter, L.A., Moninger, T.O., Rokhlina, T., Kern, J.A., Zabner, J., and Welsh, M.J. (2003). Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. Nature *422*, 322-326.

Xu, J., Lamouille, S., and Derynck, R. (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. Cell research *19*, 156-172.

Zegers, M.M., O'Brien, L.E., Yu, W., Datta, A., and Mostov, K.E. (2003). Epithelial polarity and tubulogenesis in vitro. Trends in cell biology *13*, 169-176.

Zheng, B., and Cantley, L.C. (2007). Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 819-822.















Figure 5



Supplementary figure 1

DISCUSSION

Le rôle de la polarité apico-basale dans la modulation de la voie TGF-ß dans les cellules épithéliales

Le TGF-ß est exprimé par la majorité des cellules du corps humain dont les cellules épithéliales. La bonne régulation de la voie TGF-ß est nécessaire pour maintenir l'homéostasie des tissus épithéliaux, et sa dérégulation est impliquée dans des pathologies telles que la fibrose et le cancer. A la différence des autres types cellulaires, les cellules épithéliales ont la particularité de développer, quand cultivées à forte confluence, une polarité apico-basale et de former ainsi des épithéliums polarisés. Cela, n'est pas sans incidence sur les voies de signalisation cellulaires telles celles régulées par les facteurs de croissance.

Afin d'étudier la signalisation TGF-ß dans le contexte de la polarité apico-basale, nous avons cultivé des cellules épithéliales et non épithéliales à forte densité cellulaire. L'analyse de la phosphorylation des SMADs et de l'expression des gènes cibles du TGF-ß montrent, suite à l'ajout apical du ligand TGF-ß, une perte de l'activation de la voie TGF-ß seulement dans les cellules épithéliales cultivées à haute densité concomitamment à l'établissement de contacts cellule-cellule. Cette résistance au TGF-ß apical est associée à une relocalisation des récepteurs du TGF-ß qui deviennent exclusivement basolatéraux au lieu d'être distribués tout autour de la membrane cellulaire. De plus, la destruction des jonctions inter-cellulaires par une déplétion en calcium, ou l'ajout du ligand TGF-ß au niveau basolatéral, permet de restaurer l'activation de la voie TGF-ß. L'effet de la déplétion en calcium peut être expliqué par la perte de la fonction de barrière des jonctions serrées permettant la diffusion du ligand TGF-ß à travers l'espace paracellulaire et/ou la perte de la fonction de clôture des jonctions serrées permettant la relocalisation des récepteurs du TGF-ß au niveau apical des cellules épithéliales. Ces résultats sont en accord avec les données déjà observées dans des cellules épithéliales MDCK (Madin-Darby canine kidney), montrant que la localisation des récepteurs

au TGF-ß change suite à l'établissement de la polarité apico-basale (Murphy et al., 2004). L'analyse du récepteur de type II a montré qu'un élément unique, appelé le motif LTA, entre les résidus 529 et 538, était nécessaire et suffisant pour l'adressage basolatéral de ce dernier suite à l'établissement de la polarité. Les récepteurs TGFβ tronqués pour ce motif perdent leur localisation basolatérale (Murphy et al., 2007).

A la différence des autres lignées épithéliales étudiées, EpH4 et MDCK, nous n'avons pas observé une résistance au TGF-ß apical des cellules HaCat cultivées à forte densité cellulaire. Ces résultats peuvent être expliqués par l'incapacité des cellules Hacat d'établir une polarité apico-basale. Cela est cohérent avec le rôle physiologique *in vivo* de ces cellules. Dans les épithéliums simples formés par des cellules, comme les cellules EpH4, MDCK, la polarité apico-basale est essentielle pour leurs multiples fonctions telles que leur fonction de barrière et de transport d'oxygène et de nutriments entre l'intérieur et l'extérieur du corps, alors que dans la peau, les kératinocytes (telles que les HaCat) forment un épithélium stratifié, où la barrière et les fonctions protectrices sont dues à l'empilement des cellules et à la libération des lipides qui s'étendent sur la surface cellulaire et imperméabilisent la couche.

Ainsi, dans la première partie du projet, nous avons démontré que la perte de réponse au TGF-ß liée à la densité est exclusivement observée dans les cellules épithéliales polarisées et reflète l'établissement de jonctions intercellulaires dépendantes du calcium qui empêchent le ligand TGF-ß d'accéder et d'activer ses récepteurs au niveau basolatéral. Ceci, à son tour, empêche la phosphorylation des protéines SMADs, et par voie de conséquence, leur accumulation nucléaire et l'activation de l'expression des gènes cible du TGF-ß. Ces résultats nous ont permis d'établir un nouveau modèle décrivant la signalisation TGF- ß dans les cellules épithéliales polarisées (Figure 25). Notre modèle a été confirmé dans une étude plus récente utilisant des colonies de cellules souches embryonnaires humaines (hESCs). La culture des cellules sur des micropatterns a révélé qu'en réponse au TGF-ß apical, l'accumulation nucléaire des R-SMAD était restreinte à la périphérie des colonies et directement liées à la localisation apicale des récepteurs de TGF-ß (Etoc et al., 2016).

132



Figure 25 : Modèle décrivant la signalisation TGF-ß dans les cellules épithéliales polarisées. A faible densité cellulaire, le ligand TGF-ß est capable d'activer ses récepteurs localisés de façon uniforme au niveau membranaire, permettant ainsi l'activation de la signalisation TGF-ß. A forte densité cellulaire, l'établissement de la polarité apico-basale induit à la fois une relocalisation des récepteurs du TGF-ß, qui deviennent exclusivement basolatéraux, et l'imperméabilité de l'épithélium aux macromolécules dont le TGF-ß. Les cellules deviennent donc résistantes à l'induction apicale par le TGF-ß, en restant sensibles au TGF-ß basolatéral. Adapté de (Ben Mimoun and Mauviel, 2018).

Dans notre étude l'induction de la voie TGF-ß est réalisée par ajout du ligand TGF-ß au niveau apical ou au niveau basolatéral des cellules. Or, les cellules épithéliales sécrètent par elles même le ligand TGF-ß et il a été montré que ce processus est également affecté par la polarité apico-basale. A l'inverse aux récepteurs, l'étude du ligand TGF-ß dans des cellules MDCK montre que ce dernier est secrété uniquement du domaine apical de la membrane cytoplasmique (Murphy et al., 2004). Cette observation confirme l'importance, non seulement *in vitro*, mais également dans un contexte physiologique de notre modèle qui permet de mettre en question l'étendue des activités autocrines et paracrines du TGF-ß et leur impact *in vivo* sur les tissus épithéliaux.

Vu la dualité de son rôle dans le développement tumoral, la régulation de la voie TGF-ß est complexe et se fait à plusieurs niveaux, allant de la sécrétion et la maturation du ligand, le recyclage et l'activation des récepteurs, la transduction du signal vers les Smads, à la formation des complexes de transcription avec divers co-represseurs et co-activateurs de transcription. En contrôlant l'accès du TGF-ß sécrété à ses récepteurs, la polarité apicobasale s'ajoute à ces mécanismes de régulation et représente donc un niveau supplémentaire de résistance au rôle pro-tumoral de la voie TGF-ß. De plus, la polarité apicobasale présente un mécanisme "suppresseur de tumeur". En effet, en induisant une résistance au TGF-ß présenté à la face apicale des cellules, la polarité apicobasale empêche la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF-ß et permet de préserver ainsi l'intégrité et la fonctionnalité des tissus épithéliaux.

Dans le contexte d'une blessure, le TGF-ß joue un rôle important dans le processus de cicatrisation (Lichtman et al., 2016). La polarité apico-basale permet de limiter l'action du TGF-ß aux cellules se trouvant au niveau de la bordure de la blessure. Vu l'altération de l'intégrité de l'épithélium, ces cellules perdent une partie de leur jonctions intercellulaires, permettant au ligand TGF-ß d'accéder à ces récepteurs et ainsi d'initier une signalisation TGF-ß autocrine et paracrine. Une fois l'intégrité du tissu épithélial restaurée, l'induction apicale de la voie est de nouveau bloquée afin d'éviter l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse ou de la fibrose (Lichtman et al., 2016).

II. L'impact de la polarité apico-basale sur l'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo

L'établissement de la polarité apico-basale ajoute une complexité supplémentaire à la signalisation TGF-ß et à son interaction avec d'autres voies de signalisation. En effet, notre étude a permis de remettre en question l'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo telle quelle était décrite dans la littérature.

Dans cette partie de l'étude, nous avons confirmé que l'activité de la voie Hippo est dépendante de la densité cellulaire. De plus, nous avons montré, en utilisant plusieurs lignées cellulaires de type épithélial et non épithélial, que cette régulation se fait indépendamment du type cellulaire comme le témoigne l'exclusion nucléaire de TAZ à confluence cellulaire (Nallet-Staub et al., 2015).

Ensuite, nous avons démontré que la résistance au TGF-ß apical des cellules confluentes est spécifique aux cellules épithéliales polarisées (Nallet-Staub et al., 2015). En effet les résultats de marquage par immunofluorescence de P-SMAD2/3 ont montré que l'ajout du TGF-ß apical permet d'activer sa voie dans les cellules de mélanome humain (1205Lu) et de kératinocytes (HaCat) cultivées à forte densité cellulaire. Le signal cytoplasmique de TAZ dans ces cellules démontre que l'accumulation de SMAD2/3 en réponse au TGF-ß est indépendante de l'expression et de la localisation de YAP/TAZ. Dans le cas particulier des cellules épithéliales polarisées, la résistance au TGF-ß apical est liée à l'incapacité du ligand TGF-ß apical d'activer ses récepteurs situés exclusivement au niveau basolatéral de la membrane, indépendamment de la signalisation Hippo (Figure 26).

Nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenue par Varelas et al. suggérant que la voie Hippo est responsable de la résistance au TGF-ß apical dans les cellules épithéliales confluentes. Le mécanisme décrit est basé sur la séquestration cytoplasmique de SMAD2/3 phosphorylée par P-YAP/TAZ (Figure 27).



Figure 26: Modèle décrivant l'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo en prenant en compte l'impact de la polarité apico-basale sur la signalisation TGF-ß. A faible densité et dans les cellules polarisée et non polarisées, TAZ (rouge) est nucléaire, SMAD2/3 (vert) est cytoplasmique et les récepteurs du TGF-ß sont membranaires et distribués tout autour des cellules. En réponse au TGF-ß, SMAD2/3 s'accumule dans le noyau avec TAZ. A forte densité, TAZ est exclu du noyau dans les cellules polarisées et non polarisées en réponse aux contacts cellule-cellule. Dans les cellules non polarisées, le TGF-ß induit la translocation nucléaire de SMAD2/3 alors que TAZ reste cytoplasmique. Dans les cellules polarisées, les récepteurs du TGF-ß sont localisés exclusivement au niveau basolatéral. L'induction apicale par le TGF-ß n'affecte pas les SMADs qui restent cytoplasmiques comme TAZ. D'après (Nallet-Staub et al., 2015).

Ce modèle est basé sur deux études. La première, utilisant des expériences de knock-down, a identifié TAZ comme requis pour l'accumulation nucléaire des complexes SMAD2/3-4 en réponse au TGF-ß, et pour l'activation transcriptionnelle de leurs gènes cibles (Varelas et al., 2008). Le même groupe a ensuite observé que YAP/TAZ dictent la localisation des complexes SMADs actifs en fonction de la densité cellulaire (Varelas et al., 2010). Leur modèle est le suivant : à forte densité cellulaire, les complexes Crumbs induisent la phosphorylation et la rétention cytoplasmique de YAP/TAZ, qui à leur tour séquestrent les complexes SMAD2/3-4 dans le cytoplasme empêchant ainsi l'induction de la voie TGF-ß (Figure 27).

Ainsi, les deux modèles expliqués ci-dessus se basent sur la même observation : la résistance des cellules épithéliales au TGF-ß apical. Cependant, au lieu de généraliser ce phénomène, comme proposé par Varelas et al., nous avons souligné sa spécificité aux cellules épithéliales polarisées. De plus, nous avons construit notre modèle en étudiant des cellules épithéliales et non épithéliales et en prenant en compte l'impact de la polarité apico-basale sur la signalisation TGF-ß, qui n'est pas le cas dans le modèle de séquestration cytoplasmique des SMADs par YAP/TAZ.

Il important de noter que la réponse des cellules EpH4 au TGF-ß basal n'a été examinée dans aucune des études réalisées par Varelas et al., or il s'agit d'un outil simple et crucial pour vérifier la validité de leur modèle. De plus, le modèle établi par Varelas est en contradiction avec des publications à la fois plus anciennes et plus récentes du même groupe. Par exemple, l'étude réalisée par Ozdamar et al. a montré une translocation nucléaire de SMAD2/3 phosphorylée en réponse au TGF-ß apical dans des cellules normales épithéliales mammaires de souris NMuMG cultivées à forte densité (Ozdamar et al., 2005). Cependant, ces résultats sont cohérents avec notre modèle : à forte densité les cellules NMuMG répondent au TGF- ß apical car elles ne se polarisent pas (Saitoh et al., 2013). Une publication plus récente par un autre auteur du même groupe a fourni des données qui contredisent leur vision de l'interaction entre la voie Hippo et la voie TGF-ß. Dans cette nouvelle étude, Hiemer et al. concluent que la voie Hippo oriente le choix entre le rôle anti et pro-tumoral du TGF-ß en modulant l'activité transcriptionnelle des complexes SMAD2/3 (Figure 28). Lorsque la voie Hippo est active, la liaison des complexes SMADs à l'ADN en



Epithélium pré-polarisé

Figure 27 : Modèle proposé par Varelas et al. (2010) illustrant la séquestration cytoplasmique des SMAD2/3-4 actifs par P-YAP/TAZ. A forte densité cellulaire et avant l'établissement complet de la polarité apico-basale, les cellules épithéliales passent par un stade de pré-polarité durant lequel l'établissement des jonctions intercellulaires et la formation des complexes Crumbs induisent la séquestration cytoplasmique de YAP/TAZ, qui séquestrent à leur tour les complexes SMAD2/3-SMAD4 activés. Ainsi, YAP/TAZ empêchent la translocation nucléaire des protéines SMADs qui est nécessaire pour l'expression des gènes cibles de la voie TGF-ß. Adapté de (Ben Mimoun and Mauviel, 2018)

absence de YAP/TAZ induit un arrêt de la prolifération cellulaire et un ralentissement de la progression tumorale (Hiemer et al., 2014).

En outre, la littérature sur le TGF-ß est remplie d'études qui utilisent des cellules confluentes pour étudier la signalisation du TGF-ß, comme par exemple dans les fibroblastes (Chung et al., 1996; Daniels et al., 2004; Mauviel et al., 1994; Wrana et al., 1991) et les kératinocytes (Kon et al., 1999; Mauviel et al., 1996). Dans ces lignées cellulaires, il y a une activation claire de la signalisation du TGF-ß par une augmentation ou une diminution de l'expression des collagènes fibrillaires et non-fibrillaires, la fibronectine, et de la protéine de la matrice SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine).

Les deux modèles ont été mis à l'épreuve par une nouvelle étude de colonies de cellules souches embryonnaires humaines (hESCs) cultivées sur des micropatterns. Les résultats montrent qu'en réponse au TGF-ß apical, l'accumulation nucléaire des R-SMADs est restreinte aux cellules de la périphérie des colonies et directement liées à la localisation apicale des récepteurs de TGF-ß dans ces cellules (Etoc et al., 2016). De plus, les cultures de hESCs à haute densité réagissaient à la BMP4 et à l'activine administrées par voie basolatérale malgré la localisation cytoplasmique de YAP/TAZ, excluant ainsi la possibilité d'une contribution de la voie Hippo à l'activation de la voie TGF-ß.

Finalement, un dernier article publié par le laboratoire de Wrana suggère que leurs découvertes dépendent fortement d'un processus transitoire qui n'aurait lieu qu'au cours de la pré-polarisation. L'étude suggère que les deux modèles coexistent et peuvent être complémentaires l'un à l'autre car ils se déroulent séquentiellement lors de l'établissement de la polarité des cellules épithéliales (Narimatsu et al., 2015). La séquestration de P-SMAD2/3 cytoplasmique par P-TAZ serait un mécanisme transitoire durant un stade de pré-polarité. Une fois la polarité établie, les récepteurs du TGF-ß se relocalisent au niveau basolatéral comme décrit dans notre modèle (Nallet-Staub et al., 2015; Narimatsu et al., 2015). Les conditions expérimentales précises nécessaires pour l'observation de ce phénomène transitoire dans les cellules EpH4 ont été récemment détaillées par les auteurs, sans présenter aucune signification physiologique de ce phénomène (Narimatsu et al., 2016). Ces derniers préconisent que l'état transitoire de pré-polarité apico-basale est visible uniquement dans l'intervalle 24h-72h après l'ensemencement des cellules. De plus, cette

139



Figure 28 : YAP/TAZ dictent le choix entre le rôle anti- et pro-tumoral du TGF-ß. La voie Hippo oriente le choix entre le rôle anti et pro-tumoral du TGF-ß en modulant l'activité transcriptionnelle des complexes SMAD2/3. Lorsque la voie Hippo est active, la liaison des complexes SMADs à l'ADN, en absence de YAP/TAZ, induit un arrêt de la prolifération cellulaire et un ralentissement de la progression tumorale. Cependant, lorsque la voie Hippo est inactive, l'interaction dans le noyau des SMADs avec YAP/TAZ induit l'expression de gènes pro-tumoraux. D'après (Hiemer et al., 2014).

n'est possible que si les cellules sont ensemencées sur un support de culture classique (sur du plastique ou du verre) et non pas dans des inserts de culture (sur une membrane poreuse). Ces auteurs suggèrent quand dans un système d'insert, les cellules EpH4 forment un épithélium multicouche. Contrairement à leurs résultats, nos observations des cellules EpH4 cultivées sur des inserts montrent la formation d'épithélium simple.

III. Caractérisation de l'établissement de la polarité apico-basale

L'organisation en épithélium des cellules épithéliales, suivie de l'établissement de la polarité apico-basale, permet d'avoir de multiples nouvelles fonctions dont la fonction de barrière physiologique contre le passage de molécules à travers l'espace para-cellulaire. Cette fonction, assurée par les jonctions serrées, est importante pour l'homéostasie tissulaire et requise pour la modulation de la voie de signalisation TGF-ß (Nallet-Staub et al., 2015). Elle peut être évaluée grâce à des paramètres biophysiques liés à la mesure de la perméabilité para-cellulaire aux ions, par la mesure de la TER (Trans-epithelial Resistance), et aux macromolécules par une mesure du passage à travers l'épithélium de molécules de FITC-Dextran fluorescentes.

Un de nos objectifs était donc de caractériser les paramètres biophysiques de la fonction de barrière épithéliale et de les comparer entre plusieurs lignées cellulaires épithéliales. En parallèle, nous avons aussi examiné la localisation de la protéine des jonctions serrées ZO-1. Nos résultats montrent que quatre jours de culture cellulaire sont suffisants pour que les EpH4, T84, MDCK I et MDCK II établissent une barrière stable et entièrement fonctionnelle contre les macromolécules dont le poids moléculaire est compris entre 4 et 40KDa. Ceci a été corrélé, sauf pour MDCKII, avec un pic des valeurs de TER, ce qui indique une restriction significative de la diffusion des ions à travers les différents épithéliums. ZO-1 est localisée à la membrane dans toutes les lignées cellulaires à l'exception de HaCat, qui est également la seule à conserver une perméabilité élevée aux ions et aux macromolécules même après 10 jours de culture cellulaire. Ce résultat était attendu puisque nous avons déjà observé que les cellules HaCat restent sensibles au TGF-ß apical quand cultivées à haute densité (Nallet-Staub et al., 2015). L'ensemble de ces résultats est en cohérence avec le rôle physiologique

in vivo des cellules épithéliales étudiées. Dans les épithéliums à couche unique, comme ceux réalisés avec des cellules EpH4, MDCK et T84, les jonctions intercellulaires et surtout les TJ représentent la principale barrière limitant la perméabilité paracellulaire. En plus de leur fonction barrière, ces lignées cellulaires ont de nombreuses autres fonctions comme le transport de l'oxygène et des nutriments, ce qui les oblige à présenter une polarité apico basale avec des protéines de transport spécifiques à la surface apicale ou basolatérale. Alors que dans la peau, les cellules kératinocytaires (HaCat) sont connues pour former un épithélium stratifié, où la barrière et les fonctions protectrices sont dues à l'empilement des cellules et à la libération des lipides qui s'étendent sur la surface cellulaire et imperméabilisent la couche.

Au vu de ces résultats, nous concluons que toutes les lignées cellulaires épithéliales ne forment pas un épithélium étanche lorsqu'elles sont cultivées à haute densité définissant deux types d'épithélium: épithélium sans barrière épithéliale ou « leaky » comme dans le cas de HaCat, et épithélium avec barrière épithéliale ou « tight » comme pour EpH4, T84 et MDCKI. La ligné MDCKII est à la fois perméable pour les ions et étanche pour les macromolécules. Pour les épithéliums de type « tight », la mesure du TER est un outil fiable et non invasif pour évaluer la fonction de barrière des épithéliums nouvellement formés, qui est une caractéristique majeure de leur établissement de la polarité apico-basale. Nous disposons ainsi d'un outil simple et non invasif pour vérifier l'état de polarisation des cellules épithéliales telles que EpH4, MDCK I et T84, pour une meilleure maitrise du modèle d'étude de la voie TGF-ß.

IV. Implication de la protéine ZO-1 dans la formation des jonctions serrées et dans la résistance des cellules épithéliales polarisées à une induction apicale au TGF-ß

Dans cette partie de l'étude, nous avons voulu examiner l'implication de la ZO-1, une protéine cytoplasmique des jonctions serrées dont la déplétion est létale au stade embryonnaire (Katsuno et al., 2008), dans l 'établissement de la polarité apico-basale et la résistance des cellules épithéliales polarisées au TGF-ß apical.

Nous avons observé que la déplétion en calcium permettait la restauration de la réponse au TGF-ß apical dans les cellules épithéliales polarisées telles que EpH4 et MDCK. Cet effet est associé à une altération de la barrière épithéliale contre la diffusion d'ions et de macromolécules à travers l'espace para-cellulaire, causée par la destruction à la fois des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. En effet, bien que la formation des jonctions serrées soit indépendante du calcium, il a été montré qu'aucun type de jonctions ne peut être maintenu lorsque les cellules sont incubées dans un milieu contenant moins de 10 µM de calcium extracellulaire (Gonzalez-Mariscal et al., 1990).

Nous avons donc voulu trouver un moyen d'altérer uniquement les jonctions serrées. Pour cela, nous avons utilisé deux techniques: une longue induction au TGF-ß et l'exposition aux rayonnements ionisants de type X, tous deux connus pour altérer la structure et les fonctions des jonctions serrées en induisant la transition épithélio-mésenchymateuse (Andarawewa et al., 2007; Valcourt et al. 2005, Xu et al., 2009). Nos résultats montrent que la longue induction au TGF-ß des cellules épithéliales polarisées n'a pas d'effet ni sur l'expression ni sur la localisation de ZO-1. Bien qu'inattendus, nos observations sont cohérentes avec l'étude réalisée par Brown et al. qui ont démontré que l'induction de l'EMT par le TGF-ß est un événement rare in vitro. L'étude a montré que les cellules EpH4, et bien d'autres lignées cellulaires épithéliales, ne présentaient aucun changement dans la morphologie cellulaire ou la ré-localisation de ZO-1 après traitement par le TGF-ß (Brown et al., 2004). De même, l'irradiation d'épithéliums EpH4 entièrement polarisés avec une dose totale de 2 Gy n'a pas altéré leur fonction barrière et leur résistance au TGF-ß apical. Nos résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par Andarawewa et al. montrant que l'irradiation des cellules HMEC avec 2, 4 et 6 Gy , diminue l'expression de ZO-1, ce qui les sensibilise significativement à l'induction de l'EMT par le TGF β (Andarawewa et al., 2007). Ces différences observées pourraient être dues à la différence du moment de l'irradiation: alors que l'irradiation a été faite peu de temps après la mise en culture des cellules dans l'étude faite par Andarawewa, nous avons irradié uniquement des épithéliums polarisés.

Finalement, nous avons examiné le rôle de ZO-1 dans la polarité apico-basale et dans la résistance des cellules polarisées au TGF-ß apical en utilisant trois clones EpH4 invalidés pour ZO-1. Nous avons d'abord démontré que l'expression de ZO-1 était complètement inhibée dans nos trois clones EpH4, sans affecter l'expression et la localisation membranaire de ZO-2
(SX). L'évaluation de la fonction barrière a montré une légère augmentation de la perméabilité aux ions pour les trois clones mutants par rapport aux cellules parentales, mais aucune différence n'a été observée pour les molécules de taille supérieure ou égale à 20KDa. Comme prévu, les trois clones dépourvus de ZO-1 sont résistant à l'induction apicale au TGFß, ce qui signifie que la fonction de clôture des jonctions serrées est intacte et permet de retenir les récepteurs du TGF-ß au niveau du domaine basolatéral de la membrane. Nous concluons donc que ZO-1 n'est pas requise pour les fonctions de barrière et de clôture des jonctions serrées, et par conséquent pour la résistance des cellules épithéliales polarisées au TGF-ß apical. Autrement dit, la localisation membranaire de ZO-1 observée dans les cellules polarisées n'est pas requise, mais plutôt est conséquence de l'établissement des jonctions serrées. La localisation ZO-1 ne devrait donc pas être utilisée comme seul marqueur pour refléter la formation de jonctions serrées fonctionnelles et l'établissement de la polarité apico-basale.

V. Conclusion générale

L'origine des études que nous avons menées ici partait d'une simple observation montrant que certaines cellules ne répondent pas au TGF-ß quand elles sont cultivées à forte densité. Une première explication est donnée par Varelas et al. à travers un modèle général affirmant que la résistance au TGF-ß est le résultat d'une séquestration cytoplasmique des SMADs activées par les substrats de la voie Hippo YAP/TAZ, suite à l'établissement des contacts cellule-cellule (Figure 27). En se basant sur des données de la littérature et vu les contradictions entre ce modèle et d'autres résultats obtenus par le même groupe, nous avons réétudié l'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo dans une variété de lignées cellulaires.

Nous avons d'abord démontré que cette observation n'est pas universelle et que seules quelques lignées cellulaires de type épithélial développent cette résistance au TGF-ß. Nous avons ensuite précisé que cette résistance dépend de la méthode de délivrance du TGF-ß : l'ajout du TGF-ß au niveau basal de l'épithélium, au lieu d'une induction apical, permet une activation normale de la voie TGF-ß. Enfin, nous avons montré que ce phénomène est lié à

l'établissement de la polarité apico-basale plutôt qu'à la densité cellulaire, réduisant le spectre des cellules concernées aux cellules épithéliales polarisées excluant toute influence de la voie Hippo.

Ainsi, pour expliquer l'observation initiale, nous avons proposé un nouveau modèle plus précis décrivant la signalisation TGF-ß spécifiquement dans les cellules épithéliales polarisées (Figure 25). Cela n'était pas sans conséquence sur l'interaction entre la voie TGF-ß et la voie Hippo (Figure 26).

En résumé, l'établissement de la polarité apico-basale est accompagnée de la mise en place, grâce aux jonctions serrées, d'une barrière épithéliale et d'une clôture séparant de la membrane plasmique en deux domaines : un domaine apical et un domaine basolatéral. L'action combinée de ces deux caractéristiques des cellules épithéliales polarisées est nécessaire pour leur résistance au TGF-ß apical car elles permettent d'empêcher le ligand TGF-ß dans l'espace apical d'accéder à ses récepteurs retenus au niveau basolatéral de la membrane plasmique (Figure 29).

Par la suite, nous avons caractérisé et comparé les paramètres biophysiques liés à la fonction de barrière de plusieurs lignées épithéliales. La corrélation observée entre l'étanchéité aux ions et aux macromolécule (4, 20, et 40 KDa) des cellules EpH4, MDCK I et T84 nous a permis de générer un outil simple et non invasif pour vérifier l'état de polarisation de ces cellules : la mesure de la TER.

En dernier lieu, nous avons démontré que la localisation membranaire de ZO-1, qui accompagne l'établissement de la polarité apico-basale, n'est pas requise pour les fonctions de barrière et de clôture des jonctions serrées, et par conséquent pour la résistance des cellules épithéliales polarisées au TGF-ß apical (Figure 29). C'est pourquoi, ZO-1 ne devrait pas être utilisé comme seul marqueur pour témoigner la formation de jonctions serrées fonctionnelles et l'établissement de la polarité apico-basale.

145



Figure 29 : ZO-1 n'est pas requise pour la mise en place des fonctions de barrière et de clôture des jonctions serrées lors de l'établissement de la polarité apico-basale. Dans le cas de cellules isolées ou lorsque l'épithélium n'est pas encore polarisé, les cellules épithéliales répondent à la fois à l'induction apicale et basolatérale par le TGF-ß. L'établissement de la polarité apico-basale implique la mise en place des jonctions serrées. Cela est corrélé à une localisation membranaire de la protéine ZO-1, dont l'inhibition n'affecte toutefois pas ce processus. L'action combinée des deux fonctions des jonctions serrées, la fonction de barrière et la fonction de clôture, est à l'origine de la résistance des cellules épithéliales polarisées au TGF-ß apical. TJs : jonctions serrées.

VI. Perspectives

• Tester notre modèle in vivo

Nos résultats permettent une meilleure compréhension, *in vitro*, de la signalisation TGF-ß et sa relation avec la densité cellulaire, la polarité apico-basale et la voie Hippo. Dans un contexte physiologique, notre modèle permet de mettre en question l'étendue des activités autocrines et paracrines du TGF-ß et leur impact *in vivo* sur les tissus épithéliaux. Sachant que le ligand TGF-ß est secrété exclusivement par le domaine apical des cellules polarisées, l'établissement de la polarité apico-basale pourrait représenter un mécanisme "suppresseur de tumeur" en empêchant la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le TGF-ß. Pour cela, il serait intéressant de développer un modèle animal pour valider notre modèle *in vivo* et réétudier, dans ce contexte, l'impact de la signalisation TGF-ß sur l'intégrité et la fonctionnalité des tissus épithéliaux dans les organes lors des processus tels que la TEM et la cicatrisation.

• Tester l'invalidation de ZO-1 dans d'autres types cellulaires que EpH4, et la redondance entre ZO-1 et ZO-2

L'utilisation des shRNA pour invalider un gène cible présente un avantage majeur comparée aux siRNA, qui est la stabilité de l'inhibition d'une génération à une autre. Cependant, la génération des clones, leur isolation et leur test prend beaucoup plus de temps qu'une inhibition par des siRNA. Contraints par le temps, nous avons restreint l'invalidation de ZO-1 à une lignée cellulaire. Notre choix des EpH4 était basé sur le fait que notre modèle a été déjà validé dans ces cellules pour lesquelles nous disposons donc d'outils d'étude, et le fait qu'elles n'expriment pas ZO-3 (Umeda et al., 2004), un des paralogues de ZO-1. Cependant, il n'est pas sans intérêt de valider nos résultats dans d'autres lignées épithéliales polarisées afin de vérifier qu'ils ne dépendants du type cellulaire.

Comme indiqué dans le chapitre 3 de ce manuscrit, les protéines ZO présente une forte homologie de séquence et partagent plusieurs domaines d'interactions protéiques. A ce propos, des études *in vivo* ont montré que ZO-1 et ZO-2 sont indépendamment essentielles

au cours du développement embryonnaire (Katsuno et al., 2008; Phua et al., 2014; Xu et al., 2008). Cependant, ces résultats n'excluent pas une redondance fonctionnelle au stade adulte. En effet, l'absence d'effet de la déplétion de ZO-1 pourrait être dûe à une compensation fonctionnelle par son paralogue ZO-2, sachant que la redondance avec ZO-3 est exclue étant non exprimée dans les cellules EpH4 (Umeda et al., 2004). Ainsi, la génération de clones d'EpH4 dépourvus soit de ZO-2, soit de ZO-1 et ZO-2 simultanément, est nécessaire pour étudier d'avantage la possible redondance fonctionnelle entre ces deux paralogues.

Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biochemistry and Cell Biology



journal homepage: www.elsevier.com/locate/biocel

Review article

Molecular mechanisms underlying TGF-ß/Hippo signaling crosstalks – Role of baso-apical epithelial cell polarity



Saber Ben Mimoun, Alain Mauviel*

Team "TGF-ß and Oncogenesis", Institut Curie, Equipe Labellisée LIGUE 2016, INSERM U1021/CNRS UMR3347, Université Paris-Sud, F91400, Orsay, France

ARTICLE INFO	A B S T R A C T
Keywords:	The ubiquitous distribution of both Hippo and TGF-ß signaling cascade components and their critical implication
Hippo TGF-ß Cell density Cell polarity Signal transduction	in tissue homeostasis and disease has led to the discovery of a remarkable slew of interesting and unique features regarding their functional crosstalks. Upstream cellular cues regulating the Hippo pathway, including cell-cell contacts and apico-basal cell polarity have been well characterized. Herein, we provide an overview of the published models of compartmentalized signaling crosstalk mechanisms between Hippo signaling and the TGF- ß/SMAD pathway. How cell polarity impacts the interaction between the two pathways is discussed, together with the specifics of cytoplasmic and nuclear events implicating SMADs and YAP/TAZ, leading to contextual regulation of target gene expression.

1. Introduction

The Hippo pathway was originally identified in functional genetic screens in Drosophila as a mechanism controlling organ size via inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis (Justice et al., 1995). Although slight variations in the phenotypes were observed, mutants of the pathway components shared a strong overgrowth phenotype.

Contact inhibition of proliferation is a phenomenon whereby normal cells in monolayers exhibit reduced proliferation, even growth arrest, when establishing cell-cell contacts. This property is often lost during neoplastic progression. Clues regarding the mechanisms by which cells sense contacts with other cells and mediates contact inhibition of proliferation have emerged over the recent years, and the Hippo signaling pathway has been identified as a major player in this process (Zhao et al., 2007). It is broadly accepted that the Hippo pathway exerts critical tumor suppressor activity, a large part of it likely linked to its implication in the control of contact inhibition. Upstream members of the cascade (kinases) are often mutated or have decreased expression in various cancers, while nuclear accumulation and/or overexpression of YAP and TAZ (Hippo substrates) is often observed in tumors (Pan 2010; Bao et al., 2011; Piccolo et al., 2013; Nallet-Staub et al., 2015).

The canonical Hippo pathway consists of a core serine kinase cascade and associated scaffolding proteins that respond to various environmental cues such as mechanotransduction, cell-matrix adhesion as well as cell-cell contacts. In mammals, the core kinase cascade

consisting in MST1/2 and LATS1/2 kinases is modulated by scaffolding proteins, SAV1 and MOB1, both of which work to promote Hippo pathway signaling. When activated, MST1/2 (Hippo homologs) phosphorylate the downstream kinases LATS1/2 (non-existent in Drosophila) (Hergovich and Hemmings 2009). Activated LATS1/2 directly interact and phosphorylate YAP and TAZ (Yorkie homologs) on Ser127 and Ser89 respectively (Zhang et al., 2008), these events respectively leading to binding of TAZ/YAP to 14-3-3 proteins and subsequent cytoplasmic sequestration and/or proteasomal degradation (reviewed in (Zhang et al., 2009; Mauviel et al., 2012)). When Hippo kinases are inactive, YAP and TAZ are hypo-phosphorylated and accumulate in the nucleus. YAP/TAZ do not have a DNA binding domain and function as transcriptional co-activators for various transcription factors, most importantly TEAD family members (Zhang et al., 2009). The above steps are summarized in Fig. 1. A transcriptional co-repressor function of YAP and TAZ was also identified, whereby a TEAD/YAP/ TAZ complex deacetylates histones and alters nucleosome occupancy of target genes by recruiting the NuRD complex, leading to the repression of DDIT4 and Trail expression, thereby promoting cell survival (Kim et al., 2015). Noteworthy, Hippo pathway components are highly conserved across species and play a similar role in cell growth and organ size control. Human YAP, Lats1, Mst2, and Mob1 can functionally rescue the corresponding Drosophila mutants (Huang et al., 2005) and the effect of Hippo pathway on organ size initially identified in Drosophila have been reported in various tissues using conditional knockout experiments in mice (Camargo et al., 2007; Zhang et al., 2010; Del Re et al., 2013). Despite widespread redundancy between

https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.03.006 Received 26 January 2018; Received in revised form 8 March 2018; Accepted 12 March 2018 Available online 12 March 2018

1357-2725/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

^{*} Corresponding author at: Institut Curie University Center, Building 110, F-91405, Orsay Cedex, France. *E-mail address:* alain.mauviel@curie.fr (A. Mauviel).



TGF-B TGF-β TGF-β SMAD2/3 SMAD7 E3 (Smurf1/2, WW1) GADD34/PP1 SMAD2/3 SKI SMAD4 **SNoN** SMAD4 → TGF-ß target genes SMAD2 SBE

Fig. 2. TGF-ß canonical signaling pathway. TGF-ß ligand binds to the type II TGF-ß receptor which recruits and activates through phosphorylation the type I receptor (TßRI). TßRI in turn phosphorylates SMAD2/3 leading to their association with SMAD4. Activated SMAD2/3-4 heterocomplexes translocate and accumulate in the nucleus to bind SMAD Binding Elements (SBE) on target gene promoter regions. Inhibitory SMAD7 binds activated TGF-ß type I receptor, preventing the phosphorylation of SMAD2/3 and leading to the proteasomal degradation of the receptor complexes through the recruitment of E3 ubiquitin ligases (Smurf1/2, WW1) or to their inactivation by recruiting the phosphatase GADD34/PP1. CREB binding protein (CBP) and p300 act as transcriptional coactivators, while SKI and SnoN act as transcriptional co-repressors for SMAD-driven gene transcription.

YAP and TAZ functions, there is more and more functional evidence that discriminate these two Hippo pathway family members in various setting. Thus, the TAZ/YAP nomenclature will only be used in instances where both proteins can substitute for each other.

Cell-cell junction proteins were the first upstream modules to be

Fig. 1. The Hippo-YAP signaling pathway in mammalian cells. A: In the absence of cell-cell contact and cell polarity, the hippo pathway is inactive. YAP/TAZ undergo nuclear translocation and bind to the transcription factor TEAD at TEAD Binding Sites (TBS) leading to the expression of genes implicated in cell proliferation, growth and anti-apoptosis. B: Establishment of cell-cell contacts and cell polarity activate the Hippo kinase cascade which phosphorylates YAP/TAZ. Depending on the type of phosphorylation, YAP/TAZ are either retained in the cytoplasm by binding to 14-3-3 proteins or degraded by the proteasome. YAP/TAZ may also be sequestered in the cytoplasm by interacting with proteins of the cell-cell junctions and polarity complexes. G-Protein Coupled Receptors (GPCRs) may either activate or inhibit the pathway depending on ligands.

characterized as contact sensors through the Hippo pathway. These junctions may be divided in 2 categories: adherens and epithelial polarity junctions. The establishment of intercellular contacts involves the cadherin proteins present at the cell surface. Homotypic binding of cadherins from neighboring cells increases with cell density and activates the Hippo pathway. This results in the phosphorylation of YAP/ TAZ and their retention in the cytoplasm, resulting in inhibition of cell proliferation (Nishioka et al., 2009; Hirate et al., 2013).

Upon establishment of cell-cell contacts, epithelial cells uniquely develop baso-apical polarity, a process that implicates the establishment of epithelial-specific intercellular junctions called Tight Junctions (TJs), along with the formation of polarity complexes. As a result, the cytoplasmic membrane of polarized cells becomes compartmentalized, with distinct domains, apical and basolateral, that exhibit heterogeneous composition in lipids and proteins and allows epithelia to serve as a physiological barrier necessary for tissue homeostasis. A number of studies both in Drosophila and mammalian cells have provided ample evidence for a direct role of the apical-basal cell polarity determinants Crumbs complex and aPKC-Par6-Par3 complex in the regulation of the Hippo pathway, via direct interaction with either upstream regulators or with YAP/TAZ (reviewed in (Genevet and Tapon 2011; Piccolo et al., 2014; Meng et al., 2016)). In addition to cell-cell contacts, signals originating from interactions of cells with their surrounding extracellular matrix and transmitting forces to the cytoskeleton lead to specific mechanotransduction signals in which YAP and TAZ are critically involved, in a Hippo-dependent or - independent manner implicated in various physiological and disease-related processes ranging from cell fate determination to tissue repair, fibrosis and cancer (reviewed in (Dupont et al., 2011; Low et al., 2014; Dupont 2016; Zanconato et al., 2016; Panciera et al., 2017).

The broad range of contexts implicating the Hippo pathway largely overlaps that of Transforming Growth Factor-ß, a family of growth factors whose ubiquitous expression plays a critical role in controlling a wide array of cellular functions during embryonic development, adult tissue homeostasis and whose deregulation is implicated in disease and tumorigenesis (reviewed in (Massague 2012; Mauviel et al., 2012; Perrot et al., 2013)). Members of the TGF-ß superfamily (TGF-ßs, activins, BMPs, GDFs...) signal via heteromeric serine/threonine kinase transmembrane receptor complexes. Canonical signaling consists in ligand binding to type II receptor, a constitutively active kinase, recruitment, *trans*-phosphorylation and activation of the signaling (type I) receptor, resulting in the phosphorylation of receptor-associated members of the SMAD family (Fig. 2). BMP receptors phosphorylate receptor-associated SMADs 1/5/8 while TGF-ß and Activin receptors phosphorylate SMAD2/3 specifically. The latter then accumulate in the nucleus as heteromeric complexes together with SMAD4, a co-SMAD common to all ligands, to regulate the transcription of target genes. Inhibitory SMADs, SMAD6 and SMAD7, interfere with TGF-ß/SMAD signaling by various mechanisms that affect receptor activity and/or receptor-associated SMAD nuclear accumulation (reviewed in (Massague 2012; Perrot et al., 2013)).

2. Hippo-TGF-ß signaling crosstalks

The first evidence for functional interaction between the TGF-ß and Hippo pathway emerged as the Hippo signaling cascade per se had not yet been uncovered. Specifically, following a yeast two-hybrid screen designed to identify new partners of the inhibitory SMAD, SMAD7, we characterized YAP1, known at the time as YAP65, as a SMAD7-interacting protein (Ferrigno et al., 2002). YAP is a prototypic WW domaincontaining protein (Chen and Sudol, 1995), a structural motif that binds PPY motifs on partner proteins, and found in SMAD7. Yet, the SMAD7-YAP interaction only partially depends on the WW-PPY domains and implicates additional peptidic sequences in both YAP and SMAD7. A mechanism was uncovered, whereby YAP acts by promoting the association of SMAD7 to activated TGF-ß receptor type I (TßRI), thereby abolishing downstream TGF-ß signaling. The SMAD7-YAP interaction was confirmed independently and shown to be independent from phosphorylation (Aragon et al., 2012).

It was then found that TAZ, a YAP holomog, binds heteromeric SMAD2/3-4 complexes in a TGF-ß-dependent fashion, and is recruited to TGFB response elements (Varelas et al., 2008). Knockdown experiments identified TAZ as critical for nuclear accumulation of SMAD2/3/ 4 complexes in response to TGF-ß, and subsequent gene target transactivation. It was proposed that TAZ nucleo-cytoplasmic shuttling defines a hierarchical system regulating both SMAD nuclear accumulation and coupling to the transcriptional machinery involved in the maintenance of self-renewal markers in human embryonic stem cells (Varelas et al., 2008). The same group subsequently found that TAZ/ YAP dictate the localization of active SMAD complexes in response to cell density-mediated formation of polarity complexes (Varelas et al., 2010). Specifically, cell density inhibits nuclear accumulation of TGF-ßactivated SMAD complexes. Mechanistically, in high-density epithelial cell cultures, activation of the Hippo pathway leads to nuclear exclusion of TAZ/YAP following phosphorylation by activated LATS, leading to cytoplasmic sequestration of active (phosphorylated) SMAD complexes by phospho-TAZ/YAP (Fig. 3A). Cell-density dependent interactions of YAP/TAZ with cell junctions, and in particular with several components of the Crumbs polarity complex, promote TAZ/YAP phosphorylation, cytoplasmic retention, and consequently suppress TGF-ß signaling. In vivo, a correlation between subcellular localization of TAZ/YAP and that of P-SMAD2/3 was observed during various stages of mouse embryogenesis. Interfering with the integrity of the Crumbs complex and destruction of cell–cell junctions in epithelial cells was found to TGF-ß-driven transcription as well as TGF-ß-dependent epithelial to mesenchymal transition. Indirect support for the activated SMAD sequestration model is provided in a study (Pefani et al., 2016) in which the authors demonstrated that the Hippo pathway scaffold protein RASSF1A is recruited to TGF- β receptor I in response to TGF- β , where it is targeted for degradation by the co-recruited E3 ubiquitin ligase ITCH. This, in turn, inactivates the MST1/LATS kinase cascade and facilitates YAP/SMAD2 interaction and subsequent nuclear translocation.

Several lines of evidence point to alternate models whereby cell density and/or cell polarity may or may not interfere with TGF-ß/ SMAD signaling. For example, in polarized NMuMG mouse mammary gland epithelial cells, TGF-ß is capable of dissolving tight junctions and induce an EMT through a mechanism whereby PAR6, a regulator of cell polarity which associates with Crumbs, Pals and other proteins to regulate the assembly of tight junctions, interacts with TGF-ß receptors and is a substrate of TßRII (Ozdamar et al., 2005). TGF-ß-induced phosphorylation of PAR6 leads to Smurf1 recruitment and subsequent degradation of RhoA, leading to dissolution of tight junctions. Yet, abrogating PAR6 phosphorylation does not alter SMAD activation and downstream transcriptional responses despite maintenance of intact tight junctions. Likewise, the serine/threonine kinase salt-inducible kinase 1 (SIK) was recently identified as a TGF-ß target gene that induces tight junction dissolution through Par3 degradation (Vanlandewijck et al., 2018).

It is worth noticing that a large body of the early literature on TGFß, at a time when both the SMAD and Hippo signaling cascades had yet to be uncovered, demonstrated active biological or transcriptional responses to TGF-ß in multiple cell types grown to confluency. These include for example the characterization of TGF-ß as a major player for extracellular matrix remodeling in various tissues such as skin, liver, bone and cartilage, that led to its characterization as a key factor for tissue repair and fibrosis. Outcomes that were measured include upand down-regulation of various ECM components (Heino et al., 1989; Ignotz et al., 1989; Redini, et al., 1991; Wrana et al., 1991; Mauviel et al., 1994; Korang et al., 1995; Chung et al., 1996; Kon et al., 1999; Daniels et al., 2004), as well as the regulation of ECM degradation via modulation of the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors (Overall et al., 1989; Overall et al., 1991; Mauviel et al.,



Fig. 3. Models for Hippo and TGF-ß signaling integration in polarized epithelial cells. (A). P-SMAD2/ 3 cytoplasmic sequestration model. In pre-polarized epithelial cells, the Hippo pathway is activated. Phosphorylated YAP/TAZ associated with polarity complex proteins bind and retain heteromeric activated SMAD2/3-4 complexes in the cytoplasm, thus interrupting SMAD signaling transduction in response to apical TGF-ß stimulation (Varelas et al., 2010; Narimatsu et al., 2016). (B), TGF-ß receptor relocalization model. In polarized epithelial cells, TGF-ß receptors are localized exclusively within the basolateral domain of epithelial cells. Tight junctions prevent apically-delivered TGF-ß from reaching the receptors. Sequestration of active SMAD complexes by YAP/TAZ does not occur, as basolateral TGF-ß ligand delivery leads to efficient phospho-SMAD2/3 nuclear translocation and expression of TGF-ß target genes despite active Hippo signaling and cytoplasmic phospho-YAP/TAZ (Nallet-Staub et al., 2015).

1996).

Thus, while there is ample evidence to rule out a generalized blockade of TGF-ß signaling by Hippo pathway activation upon establishment of cell-cell contacts, more recent studies have established that, in specific contexts, Hippo and TGF-ß signaling may either interfere or cooperate with each other to regulate cell fate. In a study comparing the response of various cell types to TGF-ß in relation to cell density, we provided evidence that mesenchymal as well as some epithelial cell types show similar TGF-ß responses, even sometimes enhanced, when cultured at either low or high cell density, irrespective of YAP/TAZ nucleo-cytoplasmic localization (Nallet-Staub et al., 2015). This indicates that activation of the Hippo pathway by cell density does not necessarily inhibit TGF-ß responses despite YAP/TAZ nuclear exclusion. Also, in several cell lines, we found that modulating YAP and TAZ levels by means of siRNAs did not affect the extent of TGF-ß signaling. In our studies, the only cell lines for which high cell density was associated with loss of TGF-ß responsiveness were those known to exhibit cell polarity with distinct apical and basolateral membrane domains when grown at high density. In these polarized epithelial cell lines, lack of a TGF-ß responsiveness was a direct reflection of basolateral TGF-ß receptors that render cells unable to respond to apically delivered TGFß ligand. However, basolaterally delivered TGF-ß ligand promotes SMAD2/3 nuclear accumulation and subsequent transcriptional response, with no sign of cytoplasmic retention of activated SMAD complex by cytoplasmic YAP/TAZ (Fig. 3B). This phenomenon is restricted to polarized epithelial cells, as fibroblasts grown to confluency do not exhibit TBR relocalization (Nallet-Staub et al., 2015). We took advantage of the TAT-fusion cell-penetrating peptide technology to generate cell-permeable TAT-SMAD3 protein, subjected or not to in vitro phosphorylation by activated TßRI. Following transduction of polarized EpH4 cells, we observed that TAT-SMAD3 was almost exclusively localized in the cytoplasm, while a large portion of TAT-SMAD3P proteins rapidly accumulated in the nucleus of cells. These data, at odds with the model of cytoplasmic sequestration of active SMAD complexes by phosphorylated YAP/TAZ (Varelas et al., 2008), led us to propose a model whereby YAP/TAZ nuclear exclusion by cell contacts is ubiquitous, and that mechanisms driving the nucleo-cytoplasmic localization of TAZ and P-SMAD are independent. This model eventually translates into situations where both YAP/TAZ and R-SMADS are fortuitously localized in the same cellular sub-compartment, with no significant implications for the outcome of TGF-ß responses. Of note, in polarized epithelial cells, BMP signals are transmitted from BMP receptor complexes exclusively localized at the basolateral surface of the cell membrane (Saitoh et al., 2013).

In line with the TGF-ß receptor relocalization model, a study using colonies human embryonic stem cells grown on a micropatterned substrate and differentiated with BMP4 found that in response to both BMP4 and TGF-ß/activin, nuclear accumulation of R-SMADs was restricted to the periphery of hESC colonies and directly linked to cell density (Etoc et al., 2016). This spatial restriction of the response to TGF-ß ligands was abolished in calcium-free culture conditions that promote disruption of tight junctions. The authors identified that only the cells on the colony edges had receptors localized to the portion of the membrane facing the extracellular medium, while cells in the center of the colonies, unresponsive to BMP4, exhibited exclusively lateral receptor localization, below the tight junctions. Thus, lateralization of TGF-ß receptors in hESCs leads to polarity- selective response to growth factors. Similar to what we described for polarized epithelial cell lines, high density cultures of hESCs were responsive to basolaterally delivered BMP4 and activin, while low-density cultures were equally responsive to both apical and basolateral presentation of ligands. In high density hESC, YAP/TAZ was mostly excluded from nuclei, ruling out the possibility of a contribution of these Hippo pathway substrates to the early TGF-ß responses. In addition to receptor relocalization, another negative feedback mechanism was identified, whereby Noggin, an early gene target of BMP4/SMAD1 in hESCs is upregulated and further restricts signaling to the edges of hESC micro-colonies. Both receptor lateralization as a function of cell density and Noggin induction were able to recapitulate the signaling dynamics of SMAD1 within gastruloid differentiation of hESC cell colonies, and were sufficient to predict fate patterning under various experimental conditions, independent of Hippo pathway activation (Deglincerti et al., 2016).

Experimental conditions may be critical to explain one model or the other. The matter of Hippo-driven cytoplasmic sequestration (Varelas et al., 2008) of active SMAD complexes (Varelas et al., 2008) vs. TßR basolateral relocalization upon epithelial polarization (Nallet-Staub et al., 2015) as mechanisms to interfere with apical TGF-ß signaling was revisited by the same group that proposed the activated SMAD cytoplasmic sequestration model. As it turns out, both models co-exist and may be complementary to each other as they take place sequentially during establishment of epithelial cell polarity (Narimatsu et al., 2015): cytoplasmic P-SMAD sequestration by P-TAZ is a transient mechanism that occurs before full polarity is established and cells go through a prepolarization state, and it is followed by TBR receptor basolateral relocalization once polarity is fully established (Narimatsu et al., 2015). Given the transient nature of P-SMAD sequestration by P-YAP/TAZ, which was not observed in our own studies (Nallet-Staub et al., 2015), a precise method to observe the phenomenon in response to apically delivered TGF-ß in pre-polarized EpH4 immortalized mouse mammary epithelial cells was recently detailed by the authors (Narimatsu et al., 2016). Whether or not SMAD sequestration occurs in pre-polarized epithelial cells upon basolateral TGF-ß ligand delivery was not addressed.

3. Context-specific target gene regulation

Various means by which R-SMADs and YAP/TAZ regulate target genes, whether in concert or antagonistically, have been uncovered and are highly contextual. In a publication comparing weakly vs. highly aggressive breast carcinoma cells lines, Hiemer et al. found out that distinct YAP/TAZ nucleo-cytoplasmic localization is linked to the differential sensitivity of breast carcinoma cell lines to TGF-ß-induced growth arrest (Hiemer et al., 2014). In weakly invasive cell lines, the Hippo pathway is active (e.g., YAP/TAZ are cytoplasmic), and TGF-ß induces tumor suppression and cytostasis via SMAD2/3/4-dependent transcriptional mechanisms whereby active SMAD complexes bind DNA in the absence of YAP/TAZ (Fig. 4A, left panel). On the other hand, when Hippo is inactive, as in highly metastatic cell lines, SMADs and YAP/TAZ participate in transcriptional complexes with the transcriptional co-activator CBP/p300 (Fig. 4A, right panel).

In human embryonic stem cells (hESC), TGF-ß is not only necessary to maintain pluripotency, but is also a key growth factor for mesendodermal differentiation (Oshimori and Fuchs, 2012). Mechanistically, in pluripotent hESCs, SMAD2/3 are associated on chromatin with the master transcription factors OCT4 and NANOG (Brown et al., 2011; Mullen et al., 2011). A mechanism underlying the switch that takes place from the moment where TGF-ß supports pluripotency to when it induces mesendodermal genes has been uncovered, that implicates Hippo pathway components (Beyer et al., 2013). In pluripotent ESCs, YAP/TAZ recruit the NuRD complex to repress the transcription of mesendodermal genes whose promoters are co-occupied by OCT4, SMAD2/3, FOXH1 and TEAD (Fig. 4B, left panel). Loss of binding of YAP/TAZ/TEAD that occurs during differentiation acts as a switch to promote mesendodermal gene expression via OCT4, SMAD2/3 and FOXH1 (Fig. 4B, right panel).

Constitutive activation of the TGF-ß pathway together with defects in Hippo signaling upregulates the Connective Tissue Growth Factor (CTGF) gene expression which modulates malignant mesothelioma growth (Fujii et al., 2012). Adjacent SMAD and TEAD binding sites on the CTGF promoter recruit a complex containing SMAD3/TEAD4/YAP/ p300. YAP knockdown strongly repressed CTGF expression yet expression TGF-ß target genes, including SMAD7, MMP2 or COL1A1, was



Fig. 4. Models for the modulation of TGF-ß signaling outcome by YAP/TAZ. (A), YAP/TAZ control the TGF-ß-induced tumorigenic phenotype of human breast cancer cells. In weakly aggressive cell lines (left panel), the Hippo pathway is active and YAP/TAZ are retained in the cytoplasm. In response to TGF-ß, SMAD2/3 undergo nuclear translocation and activate the transcription of target genes involved in tumor suppression and cytostasis. In metastatic cell lines (right panel), the Hippo pathway is inactive. Nuclear YAP/TAZ bound to TEAD transcription factors interacts with activated SMAD2/3-4 and with the shared transcriptional co-activator CBP/p300 at both SMAD-Binding Element (SBE) and TEAD-Binding Sites (TBS) to activate the transcription of metastasis-related genes (Hiemer et al., 2014). (B), YAP/TAZ dictate the choice between the TGF-β-induced mesendodermal differentiation or pluripotency in human embryonic stem cells (hESCs). In pluripotent hESCs, nuclear YAP/TAZ binds to TEAD and form a complex with active SMAD2/3, OCT4, NuRD and FOXH1 and repress the transcription of mesendodermal genes. Upon fate determination, the complex is disrupted and activated SMAD2/3-4 together with OCT4 and FOXH1 induce the expression of genes involved in the mesendodermal differentiation in absence of TEAD-YAP/TAZ components (Beyer et al., 2013).

not affected by the knockdown. This suggests high context specificity of the SMAD/YAP functional interaction and is to be linked to the existence of closely positioned *cis*-elements respectively binding SMAD3 and YAP within the CTGF promoter, not in the other target genes. Physical interaction between SMAD3 and YAP was weak and only detected upon overexpression of either of the two proteins. Endogenous SMAD3 and YAP binding could not be detected. Rather, SMAD3 appeared to bind TEAD4 more preferably than YAP and p300 was required to strengthen SMAD3/YAP complex formation. This is consistent with a previous study in which the authors identified a direct interaction between SMAD1 and YAP that regulates the transcription of BMP target genes during neural differentiation in mouse embryonic stem

cells (Alarcon et al., 2009), while Smad3/YAP binding was extremely weak compared with SMAD1/YAP binding. Another study more recently found that YAP stabilizes SMAD1 and promotes BMP2-induced neocortical astrocytic differentiation in mice (Huang et al., 2016). Formation of SMAD2/3-YAP/TAZ complexes in response to TGF-ß may also depend upon cell types, as TGF-ß induced the formation of such complexes in HaCaT keratinocytes, not in the HT-29 cell line, as determined by means of proximity ligation assay (Grannas et al., 2015). Thus, not only are the SMAD3-YAP/TAZ interactions relatively weak, but subtle mechanisms yet to be identified, are likely necessary to promote their occurrence.

Another level of complexity within the TGF-ß/SMAD and Hippo/ YAP/TAZ pathway crosstalks was recently uncovered. TGF-ß induces robust TAZ, but not YAP, protein expression in both mesenchymal and epithelial cells through a SMAD3-independent, p38/MAPK-dependent mechanism that triggers myocardin-related transcription factor (MRTF) phosphorylation, the latter binding to a CC(A/T-rich)6GG(CArG) box on the TAZ promoter to drive its transactivation (Miranda et al., 2017).

Finally, another level of crosstalk between the TGF-ß and Hippo pathway may implicate the SKI and SnoN oncoproteins that play a role as repressors of SMAD proteins and whose stability is greatly controlled by TGF-ß (reviewed in (Deheuninck and Luo, 2009)). They may act either in the cytoplasm to sequester SMADs or in the nucleus to repress SMAD-dependent transcription (Krakowski et al., 2005), and their effect may depend on context as TGF-ß may fight back by inducing their rapid degradation (Javelaud et al., 2011). SKI was found to inhibit the transcriptional activity of YAP/TAZ via physical interactions with LATS2 and other upstream components of the Hippo pathway leading to increased phosphorylation and subsequent degradation of YAP/TAZ (Rashidian et al., 2015). A LATS2-independent mechanism specific for TAZ was also unveiled, whereby SKI recruits the co-repressor NCoR1 to TAZ-TEAD complexes to inhibit their transcriptional activity. Regarding the SKI homolog SnoN, it was also found to interact with LATS2 and other Hippo components, yet in this case, promoting TAZ stabilization and enhancing its oncogenic activities (Zhu et al., 2016). Given the context-specific interference of SKI and SnoN with TGF-ß signaling, these two studies further exemplify the complexity of understanding the full array of Hippo/TGFß crosstalks in context.

4. Conclusions

Hippo and TGF-ß signaling crosstalks occur in a variety of mechanisms that may affect TGF-ß receptor activity, SMAD2/3 nuclear translocation, joint or exclusive transcriptional responses implicating or not various other transcriptional partners, depending on context. The intricate connection between Hippo and TGF-ß and its implication to regulate cell fate or tumorigenesis is only a small drop in the ocean of crosstalks involving these pathways. Noteworthy, genome-wide analyses of YAP/TAZ binding to chromatin regions has uncovered remarkable and unexpected new functions for these Hippo substrates. YAP was found to recruit the Mediator complex and CDK9-elongating kinase to enhancer and super-enhancer regions of the genomes to modulate transcription from these elements by regulating transcriptional elongation by DNA polymerase II (Galli et al., 2015). This mechanism contributes to YAP growth promoting and oncogenic activities. An additional mechanism was also uncovered, whereby YAP/TAZ/ TEAD complexes are widely associated with Activator Protein-1 (AP-1) transcription factors (JUN and FOS dimers) throughout the genome where they co-occupy chromatin at composite cis-elements that comprise both TEAD and AP-1 binding motifs (Zanconato et al., 2015). This allows YAP/TAZ and AP-1 to form a complex that regulates cell cyclerelated genes, required for AP-1-driven skin tumorigenesis. A label-free quantitative proteomic analysis of the YAP/TAZ interactome (Kohli et al., 2014) failed to identify SMADs as potential YAP/TAZ partners, yet identified a number of previously characterized interaction partners, as well as novel ones implicated in the regulation of TEAD-

dependent transcription. Both whole genome and proteomics approaches indicate the complex array of functional interactions implicating YAP and TAZ, well beyond TGF-ß signaling and exemplifies the difficulty of targeting these proteins in disease, as it may disrupt multiple nodes necessary for tissue homeostasis.

Acknowledgements

Our work is supported by grants from Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée LIGUE-2016), Institut National du Cancer (INCa MELA13-002), INSERM, CNRS, Institut Curie, Donation Henriette et Emile Goutière, and Université Paris-Sud (to AM). SBM was recipient of a PhD contract from the Ministry of Higher Education, Research and Innovation (France), and an extension granted by Institut Curie. We thank Véronique Marsaud and Delphine Javelaud for critical reading of our manuscript.

References

- Alarcon, C., Zaromytidou, A.I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., Sapkota, G., Pan, D., Massague, J., 2009. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. Cell 139 (4), 757–769.
- Aragon, E., Goerner, N., Xi, Q., Gomes, T., Gao, S., Massague, J., Macias, M.J., 2012. Structural basis for the versatile interactions of Smad7 with regulator WW domains in TGF-beta Pathways. Structure 20 (10), 1726–1736.
- Bao, Y., Hata, Y., Ikeda, M., Withanage, K., 2011. Mammalian Hippo pathway: from development to cancer and beyond. J. Biochem. 149 (4), 361–379.
- Beyer, T.A., Weiss, A., Khomchuk, Y., Huang, K., Ogunjimi, A.A., Varelas, X., Wrana, J.L., 2013. Switch enhancers interpret TGF-beta and Hippo signaling to control cell fate in human embryonic stem cells? Cell Rep. 5 (6), 1611–1624.
- Brown, S., Teo, A., Pauklin, S., Hannan, N., Cho, C.H., Lim, B., Vardy, L., Dunn, N.R., Trotter, M., Pedersen, R., Vallier, L., 2011. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors? Stem Cells 29 (8), 1176–1185.
- Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., Brummelkamp, T.R., 2007. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells? Curr. Biol. 17 (23), 2054–2060.
- Chen, H.I., Sudol, M., 1995. The WW domain of Yes-associated protein binds a prolinerich ligand that differs from the consensus established for Src homology 3-binding modules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92 (17), 7819–7823.
- Chung, K.Y., Agarwal, A., Uitto, J., Mauviel, A., 1996. An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta? J. Biol. Chem. 271 (6), 3272–3278.
- Daniels, C.E., Wilkes, M.C., Edens, M., Kottom, T.J., Murphy, S.J., Limper, A.H., Leof, E.B., 2004. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. J. Clin. Invest. 114 (9), 1308–1316.
- Deglincerti, A., Etoc, F., Ozair, M.Z., Brivanlou, A.H., 2016. Self-organization of spatial patterning in human embryonic stem cells. Curr. Top. Dev. Biol. 116, 99–113.
- Deheuninck, J., Luo, K., 2009. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. Cell Res. 19 (1), 47–57.
- Del Re, D.P., Yang, Y., Nakano, N., Cho, J., Zhai, P., Yamamoto, T., Zhang, N., Yabuta, N., Nojima, H., Pan, D., Sadoshima, J., 2013. Yes-associated protein isoform 1 (Yap1) promotes cardiomyocyte survival and growth to protect against myocardial ischemic injury? J. Biol. Chem. 288 (6), 3977–3988.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., Piccolo, S., 2011. Role of YAP/ TAZ in mechanotransduction. Nature 474 (7350), 179–183.
- Dupont, S., 2016. Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. Exp. Cell Res. 343 (1), 42–53.
- Etoc, F., Metzger, J., Ruzo, A., Kirst, C., Yoney, A., Ozair, M.Z., Brivanlou, A.H., Siggia, E.D., 2016. A balance between secreted inhibitors and edge sensing controls gastruloid self-organization. Dev. Cell 39 (3), 302–315.
- Ferrigno, O., Lallemand, F., Verrecchia, F., L'Hoste, S., Camonis, J., Atfi, A., Mauviel, A., 2002. Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. Oncogene 21 (32), 4879–4884.
- Fujii, M., Toyoda, T., Nakanishi, H., Yatabe, Y., Sato, A., Matsudaira, Y., Ito, H., Murakami, H., Kondo, Y., Kondo, E., Hida, T., Tsujimura, T., Osada, H., Sekido, Y., 2012. TGF-beta synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. J. Exp. Med. 209 (3), 479–494.
- Galli, G.G., Carrara, M., Yuan, W.C., Valdes-Quezada, C., Gurung, B., Pepe-Mooney, B., Zhang, T., Geeven, G., Gray, N.S., de Laat, W., Calogero, R.A., Camargo, F.D., 2015. YAP drives growth by controlling transcriptional pause release from dynamic enhancers? Mol. Cell 60 (2), 328–337.
- Genevet, A., Tapon, N., 2011. The Hippo pathway and apico-basal cell polarity. Biochem. J. 436 (2), 213–224.
- Grannas, K., Arngarden, L., Lonn, P., Mazurkiewicz, M., Blokzijl, A., Zieba, A., Soderberg, O., 2015. Crosstalk between hippo and TGFbeta: subcellular localization of YAP/ TAZ/Smad complexes. J. Mol. Biol. 427 (21), 3407–3415.
- Heino, J., Ignotz, R.A., Hemler, M.E., Crouse, C., Massagué, J., 1989. Regulation of cell

International Journal of Biochemistry and Cell Biology 98 (2018) 75-81

adhesion receptors by transforming growth factor- beta?: Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. J. Biol. Chem. 264 (1), 380–388. Hergovich, A., Hemmings, B.A., 2009. Mammalian NDR/LATS protein kinases in hippo

- tumor suppressor signaling. Biofactors 35 (4), 338–345.
 Hiemer, S.E., Szymaniak, A.D., Varelas, X., 2014. The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor beta-induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. J. Biol. Chem. 289 (19), 13461–13474.
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Suzuki, A., Alarcon, V.B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., Ohno, S., Marikawa, Y., Nakao, K., Shimono, A., Sasaki, H., 2013. Polarity-dependent distribution of angiomotin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos? Curr. Biol. 23 (13), 1181–1194.
- Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., Pan, D., 2005. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. Cell 122 (3), 421–434.
- Huang, Z., Hu, J., Pan, J., Wang, Y., Hu, G., Zhou, J., Mei, L., Xiong, W.C., 2016. YAP stabilizes SMAD1 and promotes BMP2-induced neocortical astrocytic differentiation? Development 143 (13), 2398–2409.
- Ignotz, R.A., Heino, J., Massagué, J., 1989. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor- beta?: Regulation of vitronectin receptor and LFA-1. J. Biol. Chem. 264 (1), 389–392.
- Javelaud, D., van Kempen, L., Alexaki, V.I., Le Scolan, E., Luo, K., Mauviel, A., 2011. Efficient TGF-beta/SMAD signaling in human melanoma cells associated with high c-SKI/SnoN expression. Mol. Cancer 10 (1), 2.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., Bryant, P.J., 1995. The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. Genes Dev. 9 (5), 534–546.
- Kim, M., Kim, T., Johnson, R.L., Lim, D.S., 2015. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ? Cell Rep. 11 (2), 270–282.
- Kohli, P., Bartram, M.P., Habbig, S., Pahmeyer, C., Lamkemeyer, T., Benzing, T., Schermer, B., Rinschen, M.M., 2014. Label-free quantitative proteomic analysis of the YAP/TAZ interactome? Am. J. Physiol. Cell Physiol. 306 (9), C805–818.
- Kon, A., Vindevoghel, L., Kouba, D.J., Fujimura, Y., Uitto, J., Mauviel, A., 1999. Cooperation between SMAD and NF-kappaB in growth factor regulated type VII collagen gene expression. Oncogene 18 (10), 1837–1844.
- Korang, K., Christiano, A.M., Uitto, J., Mauviel, A., 1995. Differential cytokine modulation of the genes LAMA3 LAMB3, and LAMC2, encoding the constitutive polypeptides, alpha 3, beta 3, and gamma 2, of human laminin 5 in epidermal keratinocytes. FEBS Lett. 368 (3), 556–558.
- Krakowski, A.R., Laboureau, J., Mauviel, A., Bissell, M.J., Luo, K., 2005. Cytoplasmic SnoN in normal tissues and nonmalignant cells antagonizes TGF-{beta} signaling by sequestration of the Smad proteins? Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (35), 12437–12442.
- Low, B.C., Pan, C.Q., Shivashankar, G.V., Bershadsky, A., Sudol, M., Sheetz, M., 2014. YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth? FEBS Lett. 588 (16), 2663–2670.
- Massague, J., 2012. TGFbeta signalling in context. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13 (10), 616–630.
- Mauviel, A., Lapiere, J.C., Halcin, C., Evans, C.H., Uitto, J., 1994. Differential cytokine regulation of type I and type VII collagen gene expression in cultured human dermal fibroblasts? J. Biol. Chem. 269 (1), 25–28.
- Mauviel, A., Chung, K.Y., Agarwal, A., Tamai, K., Uitto, J., 1996. Cell-specific induction of distinct oncogenes of the Jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expression by transforming growth factor-beta in fibroblasts and keratinocytes? J. Biol. Chem. 271 (18), 10917–10923.
- Mauviel, A., Nallet-Staub, F., Varelas, X., 2012. Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way? Oncogene 31 (14), 1743–1756.
- Meng, Z., Moroishi, T., Guan, K.L., 2016. Mechanisms of Hippo pathway regulation? Genes Dev. 30 (1), 1–17.
- Miranda, M.Z., Bialik, J.F., Speight, P., Dan, Q., Yeung, T., Szaszi, K., Pedersen, S.F., Kapus, A., 2017. TGF-beta1 regulates the expression and transcriptional activity of TAZ protein via a Smad3-independent, myocardin-related transcription factormediated mechanism. J. Biol. Chem. 292 (36), 14902–14920.
- Mullen, A.C., Orlando, D.A., Newman, J.J., Loven, J., Kumar, R.M., Bilodeau, S., Reddy, J., Guenther, M.G., DeKoter, R.P., Young, R.A., 2011. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling. Cell 147 (3), 565–576.
- Nallet-Staub, F., Yin, X., Gilbert, C., Marsaud, V., Ben Mimoun, S., Javelaud, D., Leof, E.B., Mauviel, A., 2015. Cell density sensing alters TGF-beta signaling in a cell-type-specific manner, independent from hippo pathway activation. Dev. Cell 32 (5), 640–651.
- Narimatsu, M., Samavrchi-Tehrani, P., Varelas, X., Wrana, J.L., 2015. Distinct polarity cues direct Taz/Yap and TGFbeta receptor localization to differentially control TGFbeta-induced smad signaling. Dev. Cell 32 (5), 652–656.
- Narimatsu, M., Labibi, B., Wrana, J.L., Attisano, L., 2016. Analysis of Hippo and TGFbeta signaling in polarizing epithelial cells and mouse embryos. Differentiation 91 (4–5), 109–118.
- Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-

Kensicki, E.M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H., Sasaki, H., 2009. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass? Dev. Cell 16 (3), 398–410.

- Oshimori, N., Fuchs, E., 2012. The harmonies played by TGF-beta in stem cell biology. Cell Stem Cell 11 (6), 751–764.
- Overall, C.M., Wrana, J.L., Sodek, J., 1989. Independent regulation of collagenase 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. J. Biol. Chem. 264 (3), 1860–1869.
- Overall, C.M., Wrana, J.L., Sodek, J., 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factorbeta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. J. Biol. Chem. 266 (21), 14064–14071.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., Wrana, J.L., 2005. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity? Science 307 (5715), 1603–1609.
- Pan, D., 2010. The hippo signaling pathway in development and cancer. Dev. Cell 19 (4), 491–505.
- Panciera, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M., Piccolo, S., 2017. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 18 (12), 758–770.
- Pefani, D.E., Pankova, D., Abraham, A.G., Grawenda, A.M., Vlahov, N., Scrace, S., O' Neill, E., 2016. TGF-beta targets the hippo pathway scaffold RASSF1A to facilitate YAP/SMAD2 nuclear translocation. Mol. Cell 63 (1), 156–166.
- Perrot, C.Y., Javelaud, D., Mauviel, A., 2013. Overlapping activities of TGF-beta and Hedgehog signaling in cancer: therapeutic targets for cancer treatment? Pharmacol. Ther. 137 (2), 183–199.
- Piccolo, S., Cordenonsi, M., Dupont, S., 2013. Molecular pathways: YAP and TAZ take center stage in organ growth and tumorigenesis? Clin. Cancer Res. 19 (18), 4925–4930.
- Piccolo, S., Dupont, S., Cordenonsi, M., 2014. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. Physiol. Rev. 94 (4), 1287–1312.
- Rashidian, J., Le Scolan, E., Ji, X., Zhu, Q., Mulvihill, M.M., Nomura, D., Luo, K., 2015. Ski regulates Hippo and TAZ signaling to suppress breast cancer progression. Sci. Signal. 8 (363), ra14.
- Redini, F., Daireaux, M., Mauviel, A., Galera, P., Loyau, G., Pujol, J.P., 1991. Characterization of proteoglycans synthesized by rabbit articular chondrocytes in response to transforming growth factor-beta (TGF-beta)? Biochim. Biophys. Acta 1093 (2–3), 196–206.
- Saitoh, M., Shirakihara, T., Fukasawa, A., Horiguchi, K., Sakamoto, K., Sugiya, H., Beppu, H., Fujita, Y., Morita, I., Miyazono, K., Miyazawa, K., 2013. Basolateral BMP signaling in polarized epithelial cells. PLoS One 8 (5), e62659.
- Vanlandewijck, M., Dadras, M.S., Lomnytska, M., Mahzabin, T., Lee Miller, M., Busch, C., Brunak, S., Heldin, C.H., Moustakas, A., 2018. The protein kinase SIK downregulates the polarity protein Par3? Oncotarget 9 (5), 5716–5735.
- Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B.M., Dembowy, J., Yaffe, M.B., Zandstra, P.W., Wrana, J.L., 2008. TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal? Nat. Cell Biol. 10 (7), 837–848.
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., Wrana, J.L., 2010. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway? Dev. Cell 19 (6), 831–844.
- Wrana, J.L., Overall, C.M., Sodek, J., 1991. Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. Eur. J. Biochem. 197 (2), 519–528.
- Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., Piccolo, S., 2015. Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth? Nat. Cell Biol. 17 (9), 1218–1227.
- Zanconato, F., Cordenonsi, M., Piccolo, S., 2016. YAP/TAZ at the roots of cancer? Cancer Cell 29 (6), 783–803.
- Zhang, J., Smolen, G.A., Haber, D.A., 2008. Negative regulation of YAP by LATS1 underscores evolutionary conservation of the Drosophila Hippo pathway? Cancer Res. 68 (8), 2789–2794.
- Zhang, H., Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q.Y., Guan, K.L., 2009. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. J. Biol. Chem. 284 (20), 13355–13362.
- Zhang, N., Bai, H., David, K.K., Dong, J., Zheng, Y., Cai, J., Giovannini, M., Liu, P., Anders, R.A., Pan, D., 2010. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. Dev. Cell 19 (1), 27–38.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.C., Guan, K.L., 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control? Genes Dev. 21 (21), 2747–2761.
- Zhu, Q., Le Scolan, E., Jahchan, N., Ji, X., Xu, A., Luo, K., 2016. SnoN antagonizes the hippo kinase complex to promote TAZ signaling during Breast carcinogenesis? Dev. Cell 37 (5), 399–412.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alarcon, C., Zaromytidou, A.I., Xi, Q., Gao, S., Yu, J., Fujisawa, S., Barlas, A., Miller, A.N., Manova-Todorova, K., Macias, M.J., *et al.* (2009). Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. Cell *139*, 757-769.

Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (1995). Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. The American journal of physiology *269*, G467-475.

Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. J Cell Sci *116*, 217-224.

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

Assoian, R.K., Komoriya, A., Meyers, C.A., Miller, D.M., and Sporn, M.B. (1983).

Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. The Journal of biological chemistry *258*, 7155-7160.

Baker, J., and Garrod, D. (1993). Epithelial cells retain junctions during mitosis. J Cell Sci *104 (Pt 2)*, 415-425.

Balda, M.S., Garrett, M.D., and Matter, K. (2003). The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. The Journal of cell biology *160*, 423-432.

Balda, M.S., and Matter, K. (2000). The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. The EMBO journal *19*, 2024-2033. Balda, M.S., Whitney, J.A., Flores, C., Gonzalez, S., Cereijido, M., and Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. The Journal of cell biology *134*, 1031-1049.

Bellam, N., and Pasche, B. (2010). Tgf-beta signaling alterations and colon cancer. Cancer treatment and research *155*, 85-103.

Ben Mimoun, S., and Mauviel, A. (2018). Molecular mechanisms underlying TGFss/Hippo signaling crosstalks - Role of baso-apical epithelial cell polarity. The international journal of biochemistry & cell biology *98*, 75-81.

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

Bhowmick, N.A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C.A., Engel, M.E., Arteaga, C.L., and Moses, H.L. (2001). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. Mol Biol Cell *12*, 27-36.

Blanpain, C., and Fuchs, E. (2014). Stem cell plasticity. Plasticity of epithelial stem cells in tissue regeneration. Science *344*, 1242281.

Bottinger, E.P., and Kopp, J.B. (1998). Lessons from TGF-beta transgenic mice. Miner Electrolyte Metab *24*, 154-160.

Brown, R.C., and Davis, T.P. (2002). Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. Stroke *33*, 1706-1711.

Bruna, A., Darken, R.S., Rojo, F., Ocana, A., Penuelas, S., Arias, A., Paris, R., Tortosa, A., Mora, J., Baselga, J., *et al.* (2007). High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene. Cancer cell *11*, 147-160.

Bryant, D.M., and Mostov, K.E. (2008). From cells to organs: building polarized tissue. Nature reviews Molecular cell biology *9*, 887-901.

Buscemi, L., Ramonet, D., Klingberg, F., Formey, A., Smith-Clerc, J., Meister, J.J., and Hinz, B. (2011). The single-molecule mechanics of the latent TGF-beta1 complex. Current biology : CB *21*, 2046-2054.

Callus, B.A., Verhagen, A.M., and Vaux, D.L. (2006). Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. The FEBS journal *273*, 4264-4276. Camargo, F.D., Gokhale, S., Johnnidis, J.B., Fu, D., Bell, G.W., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2007). YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. Current biology : CB *17*, 2054-2060. Campbell, H.K., Maiers, J.L., and DeMali, K.A. (2017). Interplay between tight junctions & adherens junctions. Experimental cell research *358*, 39-44.

Cao, Z., and Kyprianou, N. (2015). Mechanisms navigating the TGF-beta pathway in prostate cancer. Asian journal of urology *2*, 11-18.

Cassar, L., Nicholls, C., Pinto, A.R., Chen, R., Wang, L., Li, H., and Liu, J.P. (2017). TGF-beta receptor mediated telomerase inhibition, telomere shortening and breast cancer cell senescence. Protein & cell *8*, 39-54.

Chakrabarti, J., Turley, H., Campo, L., Han, C., Harris, A.L., Gatter, K.C., and Fox, S.B. (2004). The transcription factor DEC1 (stra13, SHARP2) is associated with the hypoxic response and high tumour grade in human breast cancers. British journal of cancer *91*, 954-958.

Chan, S.W., Lim, C.J., Chong, Y.F., Pobbati, A.V., Huang, C., and Hong, W. (2011). Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomotin. The Journal of biological chemistry *286*, 7018-7026.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature *410*, 37-40.

Chapnick, D.A., Warner, L., Bernet, J., Rao, T., and Liu, X. (2011). Partners in crime: the TGFbeta and MAPK pathways in cancer progression. Cell Biosci *1*, 42.

Chaulk, S.G., Lattanzi, V.J., Hiemer, S.E., Fahlman, R.P., and Varelas, X. (2014). The Hippo pathway effectors TAZ/YAP regulate dicer expression and microRNA biogenesis through Let-7. The Journal of biological chemistry *289*, 1886-1891.

Chen, C.L., Gajewski, K.M., Hamaratoglu, F., Bossuyt, W., Sansores-Garcia, L., Tao, C., and Halder, G. (2010). The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 15810-15815.

Chen, X., and Xu, L. (2011). Mechanism and regulation of nucleocytoplasmic trafficking of smad. Cell Biosci *1*, 40.

Chung, K.Y., Agarwal, A., Uitto, J., and Mauviel, A. (1996). An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. The Journal of biological chemistry *271*, 3272-3278. Chuvin, N., Vincent, D.F., Pommier, R.M., Alcaraz, L.B., Gout, J., Caligaris, C., Yacoub, K., Cardot, V., Roger, E., Kaniewski, B., *et al.* (2017). Acinar-to-Ductal Metaplasia Induced by Transforming Growth Factor Beta Facilitates KRAS(G12D)-driven Pancreatic Tumorigenesis. Cellular and molecular gastroenterology and hepatology *4*, 263-282. Colegio, O.R., Van Itallie, C.M., McCrea, H.J., Rahner, C., and Anderson, J.M. (2002). Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. American journal of physiology Cell physiology *283*, C142-147. Conery, A.R., Cao, Y., Thompson, E.A., Townsend, C.M., Jr., Ko, T.C., and Luo, K. (2004). Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. Nature cell biology *6*, 366-372.

Cui, W., Fowlis, D.J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A., and Akhurst, R.J. (1996). TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. Cell *86*, 531-542.

Daniels, C.E., Wilkes, M.C., Edens, M., Kottom, T.J., Murphy, S.J., Limper, A.H., and Leof, E.B. (2004). Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. J Clin Invest *114*, 1308-1316.

David, C.J., Huang, Y.H., Chen, M., Su, J., Zou, Y., Bardeesy, N., Iacobuzio-Donahue, C.A., and Massague, J. (2016). TGF-beta Tumor Suppression through a Lethal EMT. Cell *164*, 1015-1030.

de Larco, J.E., and Todaro, G.J. (1978). Growth factors from murine sarcoma virustransformed cells. Proc Natl Acad Sci U S A *75*, 4001-4005.

Deheuninck, J., and Luo, K. (2009). Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF-beta signaling. Cell research *19*, 47-57.

Del Re, D.P., Yang, Y., Nakano, N., Cho, J., Zhai, P., Yamamoto, T., Zhang, N., Yabuta, N., Nojima, H., Pan, D., *et al.* (2013). Yes-associated protein isoform 1 (Yap1) promotes cardiomyocyte survival and growth to protect against myocardial ischemic injury. The Journal of biological chemistry *288*, 3977-3988.

Derynck, R., Akhurst, R.J., and Balmain, A. (2001). TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. Nature genetics *29*, 117-129.

Derynck, R., and Zhang, Y.E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature *425*, 577-584.

Devenport, D., Oristian, D., Heller, E., and Fuchs, E. (2011). Mitotic internalization of planar cell polarity proteins preserves tissue polarity. Nature cell biology *13*, 893-902. Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F., and Wrana, J.L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. Nature cell biology *5*, 410-421.

Dore, J.J., Jr., Yao, D., Edens, M., Garamszegi, N., Sholl, E.L., and Leof, E.B. (2001). Mechanisms of transforming growth factor-beta receptor endocytosis and intracellular sorting differ between fibroblasts and epithelial cells. Mol Biol Cell *12*, 675-684. Dubois, C.M., Blanchette, F., Laprise, M.H., Leduc, R., Grondin, F., and Seidah, N.G. (2001). Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. The American journal of pathology *158*, 305-316.

Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., and Leduc, R. (1995). Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. The Journal of biological chemistry *270*, 10618-10624.

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

Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. The Journal of biological chemistry *276*, 12477-12480.

Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M.K., Suzuki, A., Imhof, B.A., and Vestweber, D. (2003). The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. J Cell Sci *116*, 3879-3891.

Ehata, S., Hanyu, A., Hayashi, M., Aburatani, H., Kato, Y., Fujime, M., Saitoh, M., Miyazawa, K., Imamura, T., and Miyazono, K. (2007). Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. Cancer research *67*, 9694-9703.

Elliott, R.L., and Blobe, G.C. (2005). Role of transforming growth factor Beta in human cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *23*, 2078-2093.

Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A.E.M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalska, A.J., Oria, R., Kechagia, J.Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A.L., *et al.* (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. Cell *171*, 1397-1410 e1314.

Etoc, F., Metzger, J., Ruzo, A., Kirst, C., Yoney, A., Ozair, M.Z., Brivanlou, A.H., and Siggia, E.D. (2016). A Balance between Secreted Inhibitors and Edge Sensing Controls Gastruloid Self-Organization. Developmental cell *39*, 302-315.

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

Fanning, A.S., Little, B.P., Rahner, C., Utepbergenov, D., Walther, Z., and Anderson, J.M. (2007). The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. Mol Biol Cell *18*, 721-731.

Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. The Journal of cell biology *17*, 375-412.

Ferrigno, O., Lallemand, F., Verrecchia, F., L'Hoste, S., Camonis, J., Atfi, A., and Mauviel, A. (2002). Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF-beta/Smad signaling. Oncogene *21*, 4879-4884.

Festuccia, C., Angelucci, A., Gravina, G.L., Villanova, I., Teti, A., Albini, A., and Bologna, M. (2000). Osteoblast-derived TGF-beta1 modulates matrix degrading protease expression and activity in prostate cancer cells. International journal of cancer *85*, 407-415. Founounou, N., Loyer, N., and Le Borgne, R. (2013). Septins regulate the contractility of the actomyosin ring to enable adherens junction remodeling during cytokinesis of epithelial cells. Developmental cell *24*, 242-255.

Frey, R.S., and Mulder, K.M. (1997). TGFbeta regulation of mitogen-activated protein

kinases in human breast cancer cells. Cancer letters 117, 41-50.

Fujii, M., Toyoda, T., Nakanishi, H., Yatabe, Y., Sato, A., Matsudaira, Y., Ito, H., Murakami, H., Kondo, Y., Kondo, E., *et al.* (2012). TGF-beta synergizes with defects in the Hippo pathway to stimulate human malignant mesothelioma growth. The Journal of experimental medicine *209*, 479-494.

Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. Cold Spring Harbor perspectives in biology *2*, a002907.

Gal, A., Sjoblom, T., Fedorova, L., Imreh, S., Beug, H., and Moustakas, A. (2008). Sustained TGF beta exposure suppresses Smad and non-Smad signalling in mammary epithelial cells, leading to EMT and inhibition of growth arrest and apoptosis. Oncogene *27*, 1218-1230.

Genevet, A., Wehr, M.C., Brain, R., Thompson, B.J., and Tapon, N. (2010). Kibra is a regulator of the Salvador/Warts/Hippo signaling network. Developmental cell *18*, 300-308.

Giepmans, B.N. (2004). Gap junctions and connexin-interacting proteins. Cardiovascular research *62*, 233-245.

Giepmans, B.N., and van Ijzendoorn, S.C. (2009). Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. Biochimica et biophysica acta *1788*, 820-831.

Gleizes, P.E., Munger, J.S., Nunes, I., Harpel, J.G., Mazzieri, R., Noguera, I., and Rifkin, D.B. (1997). TGF-beta latency: biological significance and mechanisms of activation. Stem cells *15*, 190-197.

Gomis, R.R., Alarcon, C., He, W., Wang, Q., Seoane, J., Lash, A., and Massague, J. (2006). A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 12747-12752.

Gonzalez-Mariscal, L., Contreras, R.G., Bolivar, J.J., Ponce, A., Chavez De Ramirez, B., and Cereijido, M. (1990). Role of calcium in tight junction formation between epithelial cells. The American journal of physiology *259*, C978-986.

Gonzalez-Ramos, M., Calleros, L., Lopez-Ongil, S., Raoch, V., Griera, M., Rodriguez-Puyol, M., de Frutos, S., and Rodriguez-Puyol, D. (2013). HSP70 increases extracellular matrix production by human vascular smooth muscle through TGF-beta1 up-regulation. The international journal of biochemistry & cell biology *45*, 232-242.

Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K., and Miyazawa, K. (2007). Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. The Journal of biological chemistry *282*, 20603-20611.

Gottardi, C.J., Arpin, M., Fanning, A.S., and Louvard, D. (1996). The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 10779-10784. Grannas, K., Arngarden, L., Lonn, P., Mazurkiewicz, M., Blokzijl, A., Zieba, A., and Soderberg, O. (2015). Crosstalk between Hippo and TGFbeta: Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. Journal of molecular biology *427*, 3407-3415. Gravdal, K., Halvorsen, O.J., Haukaas, S.A., and Akslen, L.A. (2007). A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer. Clinical

cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *13*, 7003-7011.

Gui, T., Sun, Y., Shimokado, A., and Muragaki, Y. (2012). The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF-beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. Journal of signal transduction *2012*, 289243.

Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A., and Citi, S. (2008). The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. Biochimica et biophysica acta *1778*, 601-613.

Gunzel, D., and Yu, A.S. (2013). Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiological reviews *93*, 525-569.

Han, G., Lu, S.L., Li, A.G., He, W., Corless, C.L., Kulesz-Martin, M., and Wang, X.J. (2005). Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. J Clin Invest *115*, 1714-1723.

Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. The Journal of biological chemistry *274*, 27161-27167.

Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. Nature *371*, 257-261.

Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001). The N domain of Smad7 is essential for specific inhibition of transforming growth factorbeta signaling. The Journal of cell biology *155*, 1017-1027.

Happe, H., van der Wal, A.M., Leonhard, W.N., Kunnen, S.J., Breuning, M.H., de Heer, E., and Peters, D.J. (2011). Altered Hippo signalling in polycystic kidney disease. The Journal of pathology *224*, 133-142.

Harvey, K., and Tapon, N. (2007). The Salvador-Warts-Hippo pathway - an emerging tumour-suppressor network. Nature reviews Cancer *7*, 182-191.

Harvey, K.F., Pfleger, C.M., and Hariharan, I.K. (2003). The Drosophila Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. Cell *114*, 457-467. Harvey, K.F., Zhang, X., and Thomas, D.M. (2013). The Hippo pathway and human cancer. Nature reviews Cancer *13*, 246-257.

Hau, J.C., Erdmann, D., Mesrouze, Y., Furet, P., Fontana, P., Zimmermann, C., Schmelzle, T., Hofmann, F., and Chene, P. (2013). The TEAD4-YAP/TAZ protein-protein interaction: expected similarities and unexpected differences. Chembiochem : a European journal of chemical biology *14*, 1218-1225.

Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone, M.A., Jr., Wrana, J.L., *et al.* (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. Cell *89*, 1165-1173.

He, C., Hobert, M., Friend, L., and Carlin, C. (2002). The epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain has multiple basolateral plasma membrane localization determinants, including a dominant signal with a polyproline core. The Journal of biological chemistry *277*, 38284-38293.

He, C., Mao, D., Hua, G., Lv, X., Chen, X., Angeletti, P.C., Dong, J., Remmenga, S.W., Rodabaugh, K.J., Zhou, J., *et al.* (2015). The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. EMBO molecular medicine *7*, 1426-1449.

Heider, T.R., Lyman, S., Schoonhoven, R., and Behrns, K.E. (2007). Ski promotes tumor growth through abrogation of transforming growth factor-beta signaling in pancreatic cancer. Annals of surgery *246*, 61-68.

Heikkinen, P.T., Nummela, M., Leivonen, S.K., Westermarck, J., Hill, C.S., Kahari, V.M., and Jaakkola, P.M. (2010). Hypoxia-activated Smad3-specific dephosphorylation by PP2A. The Journal of biological chemistry *285*, 3740-3749.

Hergovich, A., Schmitz, D., and Hemmings, B.A. (2006). The human tumour suppressor LATS1 is activated by human MOB1 at the membrane. Biochemical and biophysical research communications *345*, 50-58.

Hernandez, S., Chavez Munguia, B., and Gonzalez-Mariscal, L. (2007). ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. Experimental cell research *313*, 1533-1547.

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

Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Suzuki, A., Alarcon, V.B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., *et al.* (2013). Polarity-dependent distribution of angiomotin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. Current biology : CB *23*, 1181-1194. Hoa, L., Kulaberoglu, Y., Gundogdu, R., Cook, D., Mavis, M., Gomez, M., Gomez, V., and Hergovich, A. (2016). The characterisation of LATS2 kinase regulation in Hippo-YAP signalling. Cellular signalling *28*, 488-497.

Hong, W., and Guan, K.L. (2012). The YAP and TAZ transcription co-activators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. Seminars in cell & developmental biology *23*, 785-793.

Howarth, A.G., and Stevenson, B.R. (1995). Molecular environment of ZO-1 in epithelial and non-epithelial cells. Cell motility and the cytoskeleton *31*, 323-332.

Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K., and Pan, D. (2005). The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the Drosophila Homolog of YAP. Cell *122*, 421-434.

Huang, W., Lv, X., Liu, C., Zha, Z., Zhang, H., Jiang, Y., Xiong, Y., Lei, Q.Y., and Guan, K.L. (2012). The N-terminal phosphodegron targets TAZ/WWTR1 protein for SCFbeta-TrCP-dependent degradation in response to phosphatidylinositol 3-kinase inhibition. The Journal of biological chemistry *287*, 26245-26253.

Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.G., Kuriyan, J., and Massague, J. (2001). The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. Molecular cell *8*, 671-682.

Inman, G.J., Nicolas, F.J., and Hill, C.S. (2002). Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. Molecular cell *10*, 283-294. Inoue, Y., Itoh, Y., Abe, K., Okamoto, T., Daitoku, H., Fukamizu, A., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2007). Smad3 is acetylated by p300/CBP to regulate its transactivation activity. Oncogene *26*, 500-508.

Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., and Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. The Journal of cell biology *147*, 1351-1363.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Moroi, S., and Tsukita, S. (1997). Involvement of ZO-1 in cadherinbased cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. The Journal of cell biology *138*, 181-192.

Janknecht, R., Wells, N.J., and Hunter, T. (1998). TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. Genes & development *12*, 2114-2119. Jazag, A., Ijichi, H., Kanai, F., Imamura, T., Guleng, B., Ohta, M., Imamura, J., Tanaka, Y., Tateishi, K., Ikenoue, T., *et al.* (2005). Smad4 silencing in pancreatic cancer cell lines

using stable RNA interference and gene expression profiles induced by transforming growth factor-beta. Oncogene *24*, 662-671.

Jeong, H., Bae, S., An, S.Y., Byun, M.R., Hwang, J.H., Yaffe, M.B., Hong, J.H., and Hwang, E.S. (2010). TAZ as a novel enhancer of MyoD-mediated myogenic differentiation. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *24*, 3310-3320.

Jonk, L.J., Itoh, S., Heldin, C.H., ten Dijke, P., and Kruijer, W. (1998). Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. The Journal of biological chemistry *273*, 21145-21152.

Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M., and Bryant, P.J. (1995). The Drosophila tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. Genes & development *9*, 534-546.

Kamaraju, A.K., and Roberts, A.B. (2005). Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. The Journal of biological chemistry *280*, 1024-1036.

Kanai, F., Marignani, P.A., Sarbassova, D., Yagi, R., Hall, R.A., Donowitz, M., Hisaminato, A., Fujiwara, T., Ito, Y., Cantley, L.C., *et al.* (2000). TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. The EMBO journal *19*, 6778-6791.

Kang, J.S., Saunier, E.F., Akhurst, R.J., and Derynck, R. (2008). The type I TGF-beta receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. Nature cell biology *10*, 654-664.

Kang, Y., Siegel, P.M., Shu, W., Drobnjak, M., Kakonen, S.M., Cordon-Cardo, C., Guise, T.A., and Massague, J. (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. Cancer cell *3*, 537-549.

Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., *et al.* (2008). Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. Mol Biol Cell *19*, 2465-2475. Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. Molecular cell *6*, 1365-1375.

Khursheed, M., and Bashyam, M.D. (2014). Apico-basal polarity complex and cancer. Journal of biosciences *39*, 145-155.

Kim, M., Kim, T., Johnson, R.L., and Lim, D.S. (2015). Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. Cell reports *11*, 270-282.

Kim, N.G., and Gumbiner, B.M. (2015). Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK-Src-PI3K pathway. The Journal of cell biology *210*, 503-515.

Kim, S.A., Tai, C.Y., Mok, L.P., Mosser, E.A., and Schuman, E.M. (2011). Calcium-dependent dynamics of cadherin interactions at cell-cell junctions. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 9857-9862.

Knust, E. (2002). Regulation of epithelial cell shape and polarity by cell-cell adhesion (Review). Molecular membrane biology *19*, 113-120.

Kon, A., Vindevoghel, L., Kouba, D.J., Fujimura, Y., Uitto, J., and Mauviel, A. (1999). Cooperation between SMAD and NF-kappaB in growth factor regulated type VII collagen gene expression. Oncogene *18*, 1837-1844.

Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I., and Massague, J. (1999). A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. Genes & development *13*, 804-816.

Kurisaki, A., Kose, S., Yoneda, Y., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2001). Transforming growth factor-beta induces nuclear import of Smad3 in an importin-beta1 and Randependent manner. Mol Biol Cell *12*, 1079-1091.

Lai, Z.C., Wei, X., Shimizu, T., Ramos, E., Rohrbaugh, M., Nikolaidis, N., Ho, L.L., and Li, Y. (2005). Control of cell proliferation and apoptosis by mob as tumor suppressor, mats. Cell *120*, 675-685.

LaJeunesse, D.R., McCartney, B.M., and Fehon, R.G. (1998). Structural analysis of Drosophila merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. The Journal of cell biology *141*, 1589-1599.

Lambert, D., O'Neill, C.A., and Padfield, P.J. (2005). Depletion of Caco-2 cell cholesterol disrupts barrier function by altering the detergent solubility and distribution of specific tight-junction proteins. The Biochemical journal *387*, 553-560.

Lamouille, S., and Derynck, R. (2007). Cell size and invasion in TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition is regulated by activation of the mTOR pathway. The Journal of cell biology *178*, 437-451.

Le Bras, S., and Le Borgne, R. (2014). Epithelial cell division - multiplying without losing touch. J Cell Sci *127*, 5127-5137.

Lee, D.B., Jamgotchian, N., Allen, S.G., Abeles, M.B., and Ward, H.J. (2008). A lipid-protein hybrid model for tight junction. American journal of physiology Renal physiology *295*, F1601-1612.

Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M., and Derynck, R. (2007). TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. The EMBO journal *26*, 3957-3967.

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

Lei, S., Dubeykovskiy, A., Chakladar, A., Wojtukiewicz, L., and Wang, T.C. (2004). The murine gastrin promoter is synergistically activated by transforming growth factorbeta/Smad and Wnt signaling pathways. The Journal of biological chemistry *279*, 42492-42502.

Levy, L., and Hill, C.S. (2005). Smad4 dependency defines two classes of transforming growth factor {beta} (TGF-{beta}) target genes and distinguishes TGF-{beta}-induced epithelial-mesenchymal transition from its antiproliferative and migratory responses. Molecular and cellular biology *25*, 8108-8125.

Levy, L., and Hill, C.S. (2006). Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer. Cytokine & growth factor reviews *17*, 41-58. Li, H., and Liu, J.P. (2007). Mechanisms of action of TGF-beta in cancer: evidence for Smad3 as a repressor of the hTERT gene. Annals of the New York Academy of Sciences *1114*, 56-68.

Li, H., Xu, D., Li, J., Berndt, M.C., and Liu, J.P. (2006). Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. The Journal of biological chemistry *281*, 25588-25600. Li, Y., Zhou, H., Li, F., Chan, S.W., Lin, Z., Wei, Z., Yang, Z., Guo, F., Lim, C.J., Xing, W., *et al.* (2015). Angiomotin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. Cell research *25*, 801-817.

Lichtman, M.K., Otero-Vinas, M., and Falanga, V. (2016). Transforming growth factor beta (TGF-beta) isoforms in wound healing and fibrosis. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society *24*, 215-222.

Lin, X., Duan, X., Liang, Y.Y., Su, Y., Wrighton, K.H., Long, J., Hu, M., Davis, C.M., Wang, J., Brunicardi, F.C., *et al.* (2016). PPM1A Functions as a Smad Phosphatase to Terminate TGFbeta Signaling. Cell *166*, 1597.

Ling, C., Zheng, Y., Yin, F., Yu, J., Huang, J., Hong, Y., Wu, S., and Pan, D. (2010). The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 10532-10537.

Liu, C., Xu, P., Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2009). TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling. Molecular cell *35*, 26-36.

Liu, C.Y., Zha, Z.Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S.W., Lim, C.J., Hong, W., *et al.* (2010). The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a phosphodegron and recruiting the SCF{beta}-TrCP E3 ligase. The Journal of biological chemistry *285*, 37159-37169.

Liu, W., Rui, H., Wang, J., Lin, S., He, Y., Chen, M., Li, Q., Ye, Z., Zhang, S., Chan, S.C., *et al.* (2006). Axin is a scaffold protein in TGF-beta signaling that promotes degradation of Smad7 by Arkadia. The EMBO journal *25*, 1646-1658.

Liu, Y., Miao, Y., Wang, J., Lin, X., Wang, L., Xu, H.T., and Wang, E.H. (2013). DEC1 is positively associated with the malignant phenotype of invasive breast cancers and negatively correlated with the expression of claudin-1. International journal of molecular medicine *31*, 855-860.

Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M., and Parkos, C.A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. J Cell Sci *113 (Pt 13)*, 2363-2374.

Lu, R., Johnson, D.L., Stewart, L., Waite, K., Elliott, D., and Wilson, J.M. (2014). Rab14 regulation of claudin-2 trafficking modulates epithelial permeability and lumen morphogenesis. Mol Biol Cell *25*, 1744-1754.

Luettig, J., Rosenthal, R., Barmeyer, C., and Schulzke, J.D. (2015). Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. Tissue barriers *3*, e977176.

Lye, M.F., Fanning, A.S., Su, Y., Anderson, J.M., and Lavie, A. (2010). Insights into regulated ligand binding sites from the structure of ZO-1 Src homology 3-guanylate kinase module. The Journal of biological chemistry *285*, 13907-13917.

Lynch, R.D., Francis, S.A., McCarthy, K.M., Casas, E., Thiele, C., and Schneeberger, E.E. (2007). Cholesterol depletion alters detergent-specific solubility profiles of selected tight junction proteins and the phosphorylation of occludin. Experimental cell research *313*, 2597-2610.

Maiers, J.L., Peng, X., Fanning, A.S., and DeMali, K.A. (2013). ZO-1 recruitment to alphacatenin--a novel mechanism for coupling the assembly of tight junctions to adherens junctions. J Cell Sci *126*, 3904-3915.

Mao, R., Fan, Y., Mou, Y., Zhang, H., Fu, S., and Yang, J. (2011). TAK1 lysine 158 is required for TGF-beta-induced TRAF6-mediated Smad-independent IKK/NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. Cellular signalling *23*, 222-227.

Marchiando, A.M., Graham, W.V., and Turner, J.R. (2010). Epithelial barriers in homeostasis and disease. Annual review of pathology *5*, 119-144.

Margolis, B. (2018). The Crumbs3 Polarity Protein. Cold Spring Harbor perspectives in biology *10*.

Martin-Belmonte, F., and Mostov, K. (2008). Regulation of cell polarity during epithelial morphogenesis. Current opinion in cell biology *20*, 227-234.

Martin-Belmonte, F., and Perez-Moreno, M. (2011). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. Nature reviews Cancer *12*, 23-38.

Massague, J. (1996). TGFbeta signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. Cell *85*, 947-950.

Massague, J., and Like, B. (1985). Cellular receptors for type beta transforming growth factor. Ligand binding and affinity labeling in human and rodent cell lines. The Journal of biological chemistry *260*, 2636-2645.

Matsuura, I., Wang, G., He, D., and Liu, F. (2005). Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. Biochemistry *44*, 12546-12553.

Matsuyama, S., Iwadate, M., Kondo, M., Saitoh, M., Hanyu, A., Shimizu, K., Aburatani, H., Mishima, H.K., Imamura, T., Miyazono, K., *et al.* (2003). SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. Cancer research *63*, 7791-7798. Matsuzaki, K., Kitano, C., Murata, M., Sekimoto, G., Yoshida, K., Uemura, Y., Seki, T., Taketani, S., Fujisawa, J., and Okazaki, K. (2009). Smad2 and Smad3 phosphorylated at both linker and COOH-terminal regions transmit malignant TGF-beta signal in later stages of human colorectal cancer. Cancer research *69*, 5321-5330.

Mauviel, A., Chung, K.Y., Agarwal, A., Tamai, K., and Uitto, J. (1996). Cell-specific induction of distinct oncogenes of the Jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expression by transforming growth factor-beta in fibroblasts and keratinocytes. The Journal of biological chemistry *271*, 10917-10923.

Mauviel, A., Lapiere, J.C., Halcin, C., Evans, C.H., and Uitto, J. (1994). Differential cytokine regulation of type I and type VII collagen gene expression in cultured human dermal fibroblasts. The Journal of biological chemistry *269*, 25-28.

McNeil, E., Capaldo, C.T., and Macara, I.G. (2006). Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. Mol Biol Cell *17*, 1922-1932.

Medina, R., Rahner, C., Mitic, L.L., Anderson, J.M., and Van Itallie, C.M. (2000). Occludin localization at the tight junction requires the second extracellular loop. The Journal of membrane biology *178*, 235-247.

Mehrvarz Sarshekeh, A., Advani, S., Overman, M.J., Manyam, G., Kee, B.K., Fogelman, D.R., Dasari, A., Raghav, K., Vilar, E., Manuel, S., *et al.* (2017). Association of SMAD4 mutation with patient demographics, tumor characteristics, and clinical outcomes in colorectal cancer. PLoS One *12*, e0173345.

Miettinen, P.J., Ebner, R., Lopez, A.R., and Derynck, R. (1994). TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. The Journal of cell biology *127*, 2021-2036.

Mitchell, H., Choudhury, A., Pagano, R.E., and Leof, E.B. (2004). Ligand-dependent and independent transforming growth factor-beta receptor recycling regulated by clathrinmediated endocytosis and Rab11. Mol Biol Cell *15*, 4166-4178.

Mulder, K.M., and Morris, S.L. (1992). Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. The Journal of biological chemistry *267*, 5029-5031. Murphy, S.J., Dore, J.J., Edens, M., Coffey, R.J., Barnard, J.A., Mitchell, H., Wilkes, M., and Leof, E.B. (2004). Differential trafficking of transforming growth factor-beta receptors and ligand in polarized epithelial cells. Mol Biol Cell *15*, 2853-2862. Murphy, S.J., Shapira, K.E., Henis, Y.I., and Leof, E.B. (2007). A unique element in the cytoplasmic tail of the type II transforming growth factor-beta receptor controls basolateral delivery. Mol Biol Cell *18*, 3788-3799.

Nallet-Staub, F., Yin, X., Gilbert, C., Marsaud, V., Ben Mimoun, S., Javelaud, D., Leof, E.B., and Mauviel, A. (2015). Cell density sensing alters TGF-beta signaling in a cell-type-specific manner, independent from Hippo pathway activation. Developmental cell *32*, 640-651.

Narimatsu, M., Labibi, B., Wrana, J.L., and Attisano, L. (2016). Analysis of Hippo and TGFbeta signaling in polarizing epithelial cells and mouse embryos. Differentiation; research in biological diversity *91*, 109-118.

Narimatsu, M., Samavarchi-Tehrani, P., Varelas, X., and Wrana, J.L. (2015). Distinct polarity cues direct Taz/Yap and TGFbeta receptor localization to differentially control TGFbeta-induced Smad signaling. Developmental cell *32*, 652-656.

Neuzillet, C., Tijeras-Raballand, A., Cohen, R., Cros, J., Faivre, S., Raymond, E., and de Gramont, A. (2015). Targeting the TGFbeta pathway for cancer therapy. Pharmacology & therapeutics *147*, 22-31.

Ni, L., Zheng, Y., Hara, M., Pan, D., and Luo, X. (2015). Structural basis for Mob1dependent activation of the core Mst-Lats kinase cascade in Hippo signaling. Genes & development *29*, 1416-1431.

Nicolas, F.J., De Bosscher, K., Schmierer, B., and Hill, C.S. (2004). Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. J Cell Sci *117*, 4113-4125.

Nishioka, N., Inoue, K., Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R.O., Ogonuki, N., *et al.* (2009). The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. Developmental cell *16*, 398-410.

Odenwald, M.A., Choi, W., Buckley, A., Shashikanth, N., Joseph, N.E., Wang, Y., Warren, M.H., Buschmann, M.M., Pavlyuk, R., Hildebrand, J., *et al.* (2017). ZO-1 interactions with F-actin and occludin direct epithelial polarization and single lumen specification in 3D culture. J Cell Sci *130*, 243-259.

Ohgushi, M., Kuroki, S., Fukamachi, H., O'Reilly, L.A., Kuida, K., Strasser, A., and Yonehara, S. (2005). Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. Molecular and cellular biology *25*, 10017-10028.

Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G.D., Sidhu, S.S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., *et al.* (2010). Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. The Biochemical journal *432*, 461-472.

Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., and Wrana, J.L. (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. Science *307*, 1603-1609.

Pantalacci, S., Tapon, N., and Leopold, P. (2003). The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in Drosophila. Nature cell biology *5*, 921-927.

Paramasivam, M., Sarkeshik, A., Yates, J.R., 3rd, Fernandes, M.J., and McCollum, D. (2011). Angiomotin family proteins are novel activators of the LATS2 kinase tumor suppressor. Mol Biol Cell *22*, 3725-3733.

Park, H.W., Kim, Y.C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J.S., Plouffe, S.W., Meng, Z., Lin, K.C., Yu, F.X., Alexander, C.M., *et al.* (2015). Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. Cell *162*, 780-794.

Paulsson, M. (1992). Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. Critical reviews in biochemistry and molecular biology *27*, 93-127.

Pefani, D.E., Pankova, D., Abraham, A.G., Grawenda, A.M., Vlahov, N., Scrace, S., and E, O.N.

(2016). TGF-beta Targets the Hippo Pathway Scaffold RASSF1A to Facilitate

YAP/SMAD2 Nuclear Translocation. Molecular cell 63, 156-166.

Penheiter, S.G., Mitchell, H., Garamszegi, N., Edens, M., Dore, J.J., Jr., and Leof, E.B. (2002). Internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signaling via the Smad pathway. Molecular and cellular biology *22*, 4750-4759.

Phillips, S.L., Williams, C.B., Zambrano, J.N., Williams, C.J., and Yeh, E.S. (2017). Connexin43 in the development and progression of breast cancer: What's the connection?(Review). International journal of oncology *51*, 1005-1013.

Phua, D.C., Xu, J., Ali, S.M., Boey, A., Gounko, N.V., and Hunziker, W. (2014). ZO-1 and ZO-2 are required for extra-embryonic endoderm integrity, primitive ectoderm survival and normal cavitation in embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells. PLoS One *9*, e99532.

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

Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C.H., and ten Dijke, P. (1999). TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. J Cell Sci *112 (Pt 24)*, 4557-4568. Pierreux, C.E., Nicolas, F.J., and Hill, C.S. (2000). Transforming growth factor betaindependent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. Molecular and cellular biology *20*, 9041-9054.

Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Muller, S.L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G., and Blasig, I.E. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *22*, 146-158.

Plouffe, S.W., Lin, K.C., Moore, J.L., 3rd, Tan, F.E., Ma, S., Ye, Z., Qiu, Y., Ren, B., and Guan, K.L. (2018). The Hippo pathway effector proteins YAP and TAZ have both distinct and overlapping functions in the cell. The Journal of biological chemistry.

Qiao, W., Li, A.G., Owens, P., Xu, X., Wang, X.J., and Deng, C.X. (2006). Hair follicle defects and squamous cell carcinoma formation in Smad4 conditional knockout mouse skin. Oncogene *25*, 207-217.

Qin, Z., Xia, W., Fisher, G.J., Voorhees, J.J., and Quan, T. (2018). YAP/TAZ regulates TGFbeta/Smad3 signaling by induction of Smad7 via AP-1 in human skin dermal fibroblasts. Cell communication and signaling : CCS *16*, 18.

Reguly, T., and Wrana, J.L. (2003). In or out? The dynamics of Smad nucleocytoplasmic shuttling. Trends in cell biology *13*, 216-220.

Remy, I., Montmarquette, A., and Michnick, S.W. (2004). PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. Nature cell biology *6*, 358-365.

Roberts, A.B. (1998). Molecular and cell biology of TGF-beta. Miner Electrolyte Metab *24*, 111-119.

Roberts, A.B., McCune, B.K., and Sporn, M.B. (1992). TGF-beta: regulation of extracellular matrix. Kidney international *41*, 557-559.

Rodgers, L.S., Beam, M.T., Anderson, J.M., and Fanning, A.S. (2013). Epithelial barrier assembly requires coordinated activity of multiple domains of the tight junction protein ZO-1. J Cell Sci *126*, 1565-1575.

Rodriguez-Boulan, E., and Macara, I.G. (2014). Organization and execution of the epithelial polarity programme. Nature reviews Molecular cell biology *15*, 225-242.
Rojas, A., Padidam, M., Cress, D., and Grady, W.M. (2009). TGF-beta receptor levels regulate the specificity of signaling pathway activation and biological effects of TGF-beta. Biochimica et biophysica acta *1793*, 1165-1173.

Rosso, M., Majem, B., Devis, L., Lapyckyj, L., Besso, M.J., Llaurado, M., Abascal, M.F., Matos, M.L., Lanau, L., Castellvi, J., *et al.* (2017). E-cadherin: A determinant molecule associated with ovarian cancer progression, dissemination and aggressiveness. PLoS One *12*, e0184439.

Saitoh, M., Shirakihara, T., Fukasawa, A., Horiguchi, K., Sakamoto, K., Sugiya, H., Beppu, H., Fujita, Y., Morita, I., Miyazono, K*., et al.* (2013). Basolateral BMP signaling in polarized epithelial cells. PLoS One *8*, e62659.

Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszak, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., *et al.* (2011). Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. Cell *144*, 782-795.

Schlingmann, B., Overgaard, C.E., Molina, S.A., Lynn, K.S., Mitchell, L.A., Dorsainvil White, S., Mattheyses, A.L., Guidot, D.M., Capaldo, C.T., and Koval, M. (2016). Regulation of claudin/zonula occludens-1 complexes by hetero-claudin interactions. Nature communications *7*, 12276.

Schmierer, B., and Hill, C.S. (2005). Kinetic analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling reveals a mechanism for transforming growth factor beta-dependent nuclear accumulation of Smads. Molecular and cellular biology *25*, 9845-9858.

Schulzke, J.D., Gitter, A.H., Mankertz, J., Spiegel, S., Seidler, U., Amasheh, S., Saitou, M., Tsukita, S., and Fromm, M. (2005). Epithelial transport and barrier function in occludindeficient mice. Biochimica et biophysica acta *1669*, 34-42.

Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H., and Gelbart, W.M. (1995). Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in Drosophila melanogaster. Genetics *139*, 1347-1358.

Seo, J., and Kim, J. (2018). Regulation of Hippo signaling by actin remodeling. BMB reports *51*, 151-156.

Shao, D., Zhai, P., Del Re, D.P., Sciarretta, S., Yabuta, N., Nojima, H., Lim, D.S., Pan, D., and Sadoshima, J. (2014). A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. Nature communications *5*, 3315. Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. European journal of cancer *33*, 787-791.

Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T., and Springer, T.A. (2011). Latent TGFbeta structure and activation. Nature *474*, 343-349.

Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. Cell *113*, 685-700.

Shigetomi, K., Ono, Y., Inai, T., and Ikenouchi, J. (2018). Adherens junctions influence tight junction formation via changes in membrane lipid composition. The Journal of cell biology.

Shukla, A., Malik, M., Cataisson, C., Ho, Y., Friesen, T., Suh, K.S., and Yuspa, S.H. (2009). TGF-beta signalling is regulated by Schnurri-2-dependent nuclear translocation of CLIC4 and consequent stabilization of phospho-Smad2 and 3. Nature cell biology *11*, 777-784. Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., *et al.* (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. Nature *359*, 693-699.

Siegel, P.M., Shu, W., and Massague, J. (2003). Mad upregulation and Id2 repression accompany transforming growth factor (TGF)-beta-mediated epithelial cell growth suppression. The Journal of biological chemistry *278*, 35444-35450.

Silvis, M.R., Kreger, B.T., Lien, W.H., Klezovitch, O., Rudakova, G.M., Camargo, F.D., Lantz, D.M., Seykora, J.T., and Vasioukhin, V. (2011). alpha-catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. Science signaling *4*, ra33.

Sorrentino, A., Thakur, N., Grimsby, S., Marcusson, A., von Bulow, V., Schuster, N., Zhang, S., Heldin, C.H., and Landstrom, M. (2008). The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. Nature cell biology *10*, 1199-1207.

Spadaro, D., Tapia, R., Jond, L., Sudol, M., Fanning, A.S., and Citi, S. (2014). ZO proteins redundantly regulate the transcription factor DbpA/ZONAB. The Journal of biological chemistry *289*, 22500-22511.

Staehelin, L.A. (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. J Cell Sci *13*, 763-786.

Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S., and Goodenough, D.A. (1986). Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. The Journal of cell biology *103*, 755-766.

Strano, S., Munarriz, E., Rossi, M., Castagnoli, L., Shaul, Y., Sacchi, A., Oren, M., Sudol, M., Cesareni, G., and Blandino, G. (2001). Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. The Journal of biological chemistry *276*, 15164-15173.

Strassburger, K., Tiebe, M., Pinna, F., Breuhahn, K., and Teleman, A.A. (2012). Insulin/IGF signaling drives cell proliferation in part via Yorkie/YAP. Developmental biology *367*, 187-196.

Su, T., Ludwig, M.Z., Xu, J., and Fehon, R.G. (2017). Kibra and Merlin Activate the Hippo Pathway Spatially Distinct from and Independent of Expanded. Developmental cell *40*, 478-490 e473.

Su, W.H., Mruk, D.D., Wong, E.W., Lui, W.Y., and Cheng, C.Y. (2012). Polarity protein complex Scribble/Lgl/Dlg and epithelial cell barriers. Advances in experimental medicine and biology *763*, 149-170.

Sudol, M. (1994). Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. Oncogene *9*, 2145-2152. Sudol, M., Bork, P., Einbond, A., Kastury, K., Druck, T., Negrini, M., Huebner, K., and Lehman, D. (1995). Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. The Journal of biological chemistry *270*, 14733-14741.

Takahata, M., Inoue, Y., Tsuda, H., Imoto, I., Koinuma, D., Hayashi, M., Ichikura, T., Yamori, T., Nagasaki, K., Yoshida, M*., et al.* (2009). SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells. The Journal of biological chemistry *284*, 3334-3344.

Takakuwa, R., Kokai, Y., Kojima, T., Akatsuka, T., Tobioka, H., Sawada, N., and Mori, M. (2000). Uncoupling of gate and fence functions of MDCK cells by the actin-

depolymerizing reagent mycalolide B. Experimental cell research 257, 238-244.

Takano, K., Kojima, T., Sawada, N., and Himi, T. (2014). Role of tight junctions in signal transduction: an update. EXCLI journal *13*, 1145-1162.

Tang, Y., Liu, Z., Zhao, L., Clemens, T.L., and Cao, X. (2008). Smad7 stabilizes beta-catenin binding to E-cadherin complex and promotes cell-cell adhesion. The Journal of biological chemistry *283*, 23956-23963.

Tapon, N., Harvey, K.F., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Schiripo, T.A., Haber, D., and Hariharan, I.K. (2002). salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines. Cell *110*, 467-478.

ten Dijke, P., and Arthur, H.M. (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. Nature reviews Molecular cell biology *8*, 857-869. Thomas, D.A., and Massague, J. (2005). TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. Cancer cell *8*, 369-380.

Tian, Y., Kolb, R., Hong, J.H., Carroll, J., Li, D., You, J., Bronson, R., Yaffe, M.B., Zhou, J., and Benjamin, T. (2007). TAZ promotes PC2 degradation through a SCFbeta-Trcp E3 ligase complex. Molecular and cellular biology *27*, 6383-6395.

Tokuda, S., Higashi, T., and Furuse, M. (2014). ZO-1 knockout by TALEN-mediated gene targeting in MDCK cells: involvement of ZO-1 in the regulation of cytoskeleton and cell shape. PLoS One *9*, e104994.

Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M. (1998). Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. The Journal of biological chemistry *273*, 12725-12731.

Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. Nature reviews Molecular cell biology *2*, 285-293.

Udan, R.S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C., and Halder, G. (2003). Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. Nature cell biology *5*, 914-920.

Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., and Tsukita, S. (2006). ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. Cell *126*, 741-754.

Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M., and Tsukita, S. (2004). Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking

expression of ZO-1. The Journal of biological chemistry 279, 44785-44794.

Usui, T., Takase, M., Kaji, Y., Suzuki, K., Ishida, K., Tsuru, T., Miyata, K., Kawabata, M., and Yamashita, H. (1998). Extracellular matrix production regulation by TGF-beta in corneal endothelial cells. Investigative ophthalmology & visual science *39*, 1981-1989. Utepbergenov, D.I., Fanning, A.S., and Anderson, J.M. (2006). Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. The Journal of biological chemistry *281*, 24671-24677.

Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2005). TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. Mol Biol Cell *16*, 1987-2002.

Vandana, K.L., and Gupta, I. (2009). The location of cemento enamel junction for CAL measurement: A clinical crisis. Journal of Indian Society of Periodontology *13*, 12-15.
Varelas, X., Sakuma, R., Samavarchi-Tehrani, P., Peerani, R., Rao, B.M., Dembowy, J., Yaffe, M.B., Zandstra, P.W., and Wrana, J.L. (2008). TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. Nature cell biology *10*, 837-848.

Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., and Wrana, J.L. (2010). The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF-beta-SMAD pathway. Developmental cell *19*, 831-844.

Vasileva, E., Sluysmans, S., Bochaton-Piallat, M.L., and Citi, S. (2017). Cell-specific diversity in the expression and organization of cytoplasmic plaque proteins of apical junctions. Annals of the New York Academy of Sciences *1405*, 160-176.

Ventura, J.J., Kennedy, N.J., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2004). JNK regulates autocrine expression of TGF-beta1. Molecular cell *15*, 269-278.

Vermeer, P.D., Einwalter, L.A., Moninger, T.O., Rokhlina, T., Kern, J.A., Zabner, J., and Welsh, M.J. (2003). Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. Nature *422*, 322-326.

Verrecchia, F., Vindevoghel, L., Lechleider, R.J., Uitto, J., Roberts, A.B., and Mauviel, A. (2001). Smad3/AP-1 interactions control transcriptional responses to TGF-beta in a promoter-specific manner. Oncogene *20*, 3332-3340.

Vindevoghel, L., Lechleider, R.J., Kon, A., de Caestecker, M.P., Uitto, J., Roberts, A.B., and Mauviel, A. (1998). SMAD3/4-dependent transcriptional activation of the human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor beta. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 14769-14774.

von Gise, A., Lin, Z., Schlegelmilch, K., Honor, L.B., Pan, G.M., Buck, J.N., Ma, Q., Ishiwata, T., Zhou, B., Camargo, F.D., *et al.* (2012). YAP1, the nuclear target of Hippo signaling,

stimulates heart growth through cardiomyocyte proliferation but not hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 2394-2399.

Voorneveld, P.W., Kodach, L.L., Jacobs, R.J., Liv, N., Zonnevylle, A.C., Hoogenboom, J.P., Biemond, I., Verspaget, H.W., Hommes, D.W., de Rooij, K., *et al.* (2014). Loss of SMAD4 alters BMP signaling to promote colorectal cancer cell metastasis via activation of Rho and ROCK. Gastroenterology *147*, 196-208 e113.

Wang, D., Long, J., Dai, F., Liang, M., Feng, X.H., and Lin, X. (2008). BCL6 represses Smad signaling in transforming growth factor-beta resistance. Cancer research *68*, 783-789. Watt, K.I., Judson, R., Medlow, P., Reid, K., Kurth, T.B., Burniston, J.G., Ratkevicius, A., De Bari, C., and Wackerhage, H. (2010). Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. Biochemical and biophysical research communications *393*, 619-624.

White, R.A., Malkoski, S.P., and Wang, X.J. (2010). TGFbeta signaling in head and neck squamous cell carcinoma. Oncogene *29*, 5437-5446.

Wilkes, M.C., Murphy, S.J., Garamszegi, N., and Leof, E.B. (2003). Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. Molecular and cellular biology *23*, 8878-8889.

Wittchen, E.S., Haskins, J., and Stevenson, B.R. (1999). Protein interactions at the tight junction. Actin has multiple binding partners, and ZO-1 forms independent complexes with ZO-2 and ZO-3. The Journal of biological chemistry *274*, 35179-35185.

Wrana, J.L., Overall, C.M., and Sodek, J. (1991). Regulation of the expression of a secreted acidic protein rich in cysteine (SPARC) in human fibroblasts by transforming growth factor beta. Comparison of transcriptional and post-transcriptional control with fibronectin and type I collagen. European journal of biochemistry *197*, 519-528.

Xiao, Z., Liu, X., and Lodish, H.F. (2000). Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. The Journal of biological chemistry *275*, 23425-23428.

Xie, L., Law, B.K., Aakre, M.E., Edgerton, M., Shyr, Y., Bhowmick, N.A., and Moses, H.L. (2003). Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. Breast cancer research : BCR *5*, R187-198.

Xie, L., Law, B.K., Chytil, A.M., Brown, K.A., Aakre, M.E., and Moses, H.L. (2004). Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro. Neoplasia 6, 603-610.

Xiong, S., Couzens, A.L., Kean, M.J., Mao, D.Y., Guettler, S., Kurinov, I., Gingras, A.C., and Sicheri, F. (2017). Regulation of Protein Interactions by Mps One Binder (MOB1) Phosphorylation. Molecular & cellular proteomics : MCP *16*, 1111-1125. Xu, J., Kausalya, P.J., Phua, D.C., Ali, S.M., Hossain, Z., and Hunziker, W. (2008). Early

embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but Not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. Molecular and cellular biology *28*, 1669-1678.

Xu, L., Alarcon, C., Col, S., and Massague, J. (2003). Distinct domain utilization by Smad3 and Smad4 for nucleoporin interaction and nuclear import. The Journal of biological chemistry *278*, 42569-42577.

Xu, L., Kang, Y., Col, S., and Massague, J. (2002). Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. Molecular cell *10*, 271-282.

Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., and Yu, W. (1995). Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the Drosophila lats gene encodes a putative protein kinase. Development *121*, 1053-1063.

Yagi, K., Furuhashi, M., Aoki, H., Goto, D., Kuwano, H., Sugamura, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2002). c-myc is a downstream target of the Smad pathway. The Journal of biological chemistry *277*, 854-861.

Yang, H., Kyo, S., Takatura, M., and Sun, L. (2001). Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research *12*, 119-127.

Yang, L., Mao, C., Teng, Y., Li, W., Zhang, J., Cheng, X., Li, X., Han, X., Xia, Z., Deng, H., *et al.* (2005). Targeted disruption of Smad4 in mouse epidermis results in failure of hair follicle cycling and formation of skin tumors. Cancer research *65*, 8671-8678.

Yang, Y.A., Dukhanina, O., Tang, B., Mamura, M., Letterio, J.J., MacGregor, J., Patel, S.C., Khozin, S., Liu, Z.Y., Green, J., *et al.* (2002). Lifetime exposure to a soluble TGF-beta antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. J Clin Invest *109*, 1607-1615.

Yin, F., Yu, J., Zheng, Y., Chen, Q., Zhang, N., and Pan, D. (2013). Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. Cell *154*, 1342-1355. Yingling, J.M., Blanchard, K.L., and Sawyer, J.S. (2004). Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. Nature reviews Drug discovery *3*, 1011-1022. Yu, F.X., Zhang, Y., Park, H.W., Jewell, J.L., Chen, Q., Deng, Y., Pan, D., Taylor, S.S., Lai, Z.C., and Guan, K.L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. Genes & development *27*, 1223-1232.

Yu, F.X., Zhao, B., and Guan, K.L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. Cell *163*, 811-828.

Yu, F.X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H.,

Tumaneng, K., Li, H., *et al.* (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-proteincoupled receptor signaling. Cell *150*, 780-791.

Yu, J., Pan, L., Qin, X., Chen, H., Xu, Y., Chen, Y., and Tang, H. (2010a). MTMR4 attenuates transforming growth factor beta (TGFbeta) signaling by dephosphorylating R-Smads in endosomes. The Journal of biological chemistry *285*, 8454-8462.

Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W.M., and Pan, D. (2010b). Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. Developmental cell *18*, 288-299.

Yue, J., and Mulder, K.M. (2000). Requirement of Ras/MAPK pathway activation by transforming growth factor beta for transforming growth factor beta 1 production in a smad-dependent pathway. The Journal of biological chemistry *275*, 35656.

Zaidi, S.K., Sullivan, A.J., Medina, R., Ito, Y., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., and Stein, G.S. (2004). Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription. The EMBO journal *23*, 790-799.

Zavadil, J., Bitzer, M., Liang, D., Yang, Y.C., Massimi, A., Kneitz, S., Piek, E., and Bottinger, E.P. (2001). Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 6686-6691.

Zavadil, J., and Bottinger, E.P. (2005). TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. Oncogene *24*, 5764-5774.

Zhang, J., Smolen, G.A., and Haber, D.A. (2008a). Negative regulation of YAP by LATS1 underscores evolutionary conservation of the Drosophila Hippo pathway. Cancer research *68*, 2789-2794.

Zhang, J., Zhang, X., Xie, F., Zhang, Z., van Dam, H., Zhang, L., and Zhou, F. (2014). The regulation of TGF-beta/SMAD signaling by protein deubiquitination. Protein & cell *5*, 503-517.

Zhang, L., Ren, F., Zhang, Q., Chen, Y., Wang, B., and Jiang, J. (2008b). The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. Developmental cell *14*, 377-387.

Zhang, N., Bai, H., David, K.K., Dong, J., Zheng, Y., Cai, J., Giovannini, M., Liu, P., Anders, R.A., and Pan, D. (2010). The Merlin/NF2 tumor suppressor functions through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. Developmental cell *19*, 27-38. Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. Cell research *19*, 128-139.

Zhang, Y.E. (2017). Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family. Cold Spring Harbor perspectives in biology *9*.

Zhao, B., Li, L., Lu, Q., Wang, L.H., Liu, C.Y., Lei, Q., and Guan, K.L. (2011). Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. Genes & development *25*, 51-63.

Zhao, B., Li, L., Tumaneng, K., Wang, C.Y., and Guan, K.L. (2010). A coordinated phosphorylation by Lats and CK1 regulates YAP stability through SCF(beta-TRCP). Genes & development *24*, 72-85.

Zhao, B., Ye, X., Yu, J., Li, L., Li, W., Li, S., Yu, J., Lin, J.D., Wang, C.Y., Chinnaiyan, A.M., *et al.* (2008). TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. Genes & development *22*, 1962-1971.

Zhao, B.M., and Hoffmann, F.M. (2006). Inhibition of transforming growth factor-beta1induced signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by the Smad-binding peptide aptamer Trx-SARA. Mol Biol Cell *17*, 3819-3831.

Zhao, M., Mishra, L., and Deng, C.X. (2018). The role of TGF-beta/SMAD4 signaling in cancer. International journal of biological sciences *14*, 111-123.

Zheng, B., and Cantley, L.C. (2007). Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 819-822. Zihni, C., Mills, C., Matter, K., and Balda, M.S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. Nature reviews Molecular cell biology *17*, 564-580.

Zwaagstra, J.C., El-Alfy, M., and O'Connor-McCourt, M.D. (2001). Transforming growth factor (TGF)-beta 1 internalization: modulation by ligand interaction with TGF-beta receptors types I and II and a mechanism that is distinct from clathrin-mediated endocytosis. The Journal of biological chemistry *276*, 27237-27245.