



HAL
open science

Implication de la voie de signalisation Hippo/YAP dans la résistance acquise au paclitaxel du cancer pulmonaire

Solenn Brosseau

► **To cite this version:**

Solenn Brosseau. Implication de la voie de signalisation Hippo/YAP dans la résistance acquise au paclitaxel du cancer pulmonaire. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP5006 . tel-04685754

HAL Id: tel-04685754

<https://theses.hal.science/tel-04685754>

Submitted on 3 Sep 2024

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.

Université Paris Cité

École Doctorale Hématologie Oncogénèse et Biothérapies (HOB n°561)

Unité U830 Cancer, Hétérogénéité, Instabilité et Plasticité (CHIP),
Équipe Stress et Cancer

Thèse de Doctorat, Spécialité Oncogénèse

Implication de la voie de signalisation Hippo/YAP dans la résistance acquise au paclitaxel du cancer pulmonaire

Solenn BROSSEAU

Thèse dirigée par Gérard ZALCMAN

Présentée et soutenue publiquement le 30 janvier 2023

Devant un jury composé de :

Rapporteur : Anne-Claire Toffart, PU-PH, Université Grenoble Alpes

Rapporteur : Julien Mazières, PU-PH, Université Toulouse III - Paul Sabatier

Examinatrice : Guénaëlle Levallet, PU-PH, Université de Caen - Normandie

Examinatrice : Carole Planes, PU-PH, Université Sorbonne Paris Nord

Examinateur : Etienne Giroux-Leprieur, PU-PH, Université Paris - Saclay

Examinateur : Arnaud Mailleux, CR-HDR, Université Paris Cité

Directeur de thèse : Gérard Zalczman, PU-PH, Université Paris Cité

RESUMÉ (FRANÇAIS)

Contexte : La protéine YAP est liée au processus métastatique et à la résistance à la chimiothérapie. Notre objectif était de déterminer l'effet de l'inhibition pharmacologique de YAP dans les cellules cancéreuses pulmonaires chimiorésistantes.

Méthodes : Nous avons étudié l'effet du composé CV2640, seul ou en combinaison avec le paclitaxel, sur la localisation, la migration et l'activité transcriptionnelle de YAP. Les profils transcriptomiques de cellules A549 parentales et résistantes au paclitaxel ont été analysés. La concentration inhibitrice médiane (IC50) du paclitaxel ou du tramétinib associé au CV2640 a été calculée. Un système de culture 3D a permis d'étudier l'effet du doublet CV2640/paclitaxel sur des cellules A549 mais aussi sur des cellules cancéreuses issues d'échantillons frais.

Résultats : L'activité YAP était significativement plus élevée dans les lignées cellulaires résistantes au paclitaxel. L'inhibiteur CV2640 a induit une diminution de l'activité de YAP, une réduction de sa localisation nucléaire et de la motilité cellulaire. La combinaison du CV2640 avec le tramétinib a récapitulé la létalité synthétique. L'association du CV2640 au paclitaxel a permis d'abaisser l'IC50 du paclitaxel dans les cellules chimiorésistantes. L'analyse transcriptomique différentielle a révélé une signature transcriptomique YAP/TEAD significativement augmentée dans les cellules résistantes, et diminuée en présence du CV2640. Le composé a restauré la sensibilité au paclitaxel des cellules *in vitro* cultivées dans une puce microfluidique, ainsi qu'*in vivo*.

Conclusions : Nous avons confirmé la corrélation entre YAP et la chimiorésistance au paclitaxel. YAP pourrait être une cible prometteuse pour le traitement du cancer du poumon.

Mots clefs :

Cancer du poumon, paclitaxel, chimiothérapie, Hippo, YAP, chimio-résistance, inhibiteur, séquençage ARN, lignée cellulaires, cancer sur puce

ABSTRACT (ENGLISH)

Background: The Yes-associated protein (YAP) oncoprotein has been linked to metastasis process and resistance to chemotherapy. We aimed to investigate the effect of YAP pharmacological inhibition in chemo-resistant lung cancer cells.

Methods: Upon YAP pharmacological inhibition, YAP subcellular localization, cell migration, and TEAD functional transcriptional activity were investigated in cell lines with up-regulated YAP. Transcriptomic profiles of parental (A549) and paclitaxel-resistant (A549R) cell sub-clones were analyzed. The median inhibitory concentration (IC₅₀) of paclitaxel or trametinib combined to YAP inhibitor was determined. A three-dimensional (3D) microfluidic culture device allowed studying of CV2640/paclitaxel doublet effect on cancer cells isolated from fresh resected lung cancer samples.

Results: YAP activity was significantly higher in paclitaxel-resistant cell lines. YAP inhibitor treatment of A549, PC9 and H2052 cells induced a YAP activity decrease, and a reduction in YAP nuclear staining. Wound healing assays with YAP inhibition showed impaired cell motility of lung cancer A549 and mesothelioma H2052 cells. Combining YAP pharmacological inhibition with MEK inhibitor trametinib in A549, K-Ras mutated cells, recapitulated synthetic lethality sensitizing these cells to MEK inhibition. The YAP inhibitor plus paclitaxel combo lowered paclitaxel IC₅₀ in A549R cells. Differential transcriptomic analysis of parental and A549R cells revealed that YAP/TEAD transcriptomic signature was increased in resistant cells, but significantly decreased upon YAP inhibition. YAP inhibitor was able to restore paclitaxel sensitivity to A549R cells cultured in a 3D microfluidic system, while lung cancer cells isolated from a fresh tumor were efficiently killed by YAP inhibitor/paclitaxel doublet.

Conclusions: We bring new evidence on YAP/TEAD transcriptional program role in lung cancer acquired paclitaxel resistance, opening routes for YAP targeting treatment of lung cancer.

Keywords: lung cancer; YAP (yes-associated protein); TEAD; microfluidics; chemo-resistance; paclitaxel

Lorsque j'ai rejoint l'équipe « Stress et Cancer » dirigée par Fatima Mechta-Grigoriou (U830 - Cancer, heterogeneity, instability and plasticity (CHIP)), le Dr Paula Abreu avait déjà réalisé lors d'un post-doc encadré par Gérard Zalcman, différentes expériences sur toute une série d'inhibiteurs pharmacologiques de l'interaction YAP/TEAD, développés par le laboratoire pharmaceutique Inventiva. En effet, elle avait pu ainsi tester *in vitro* l'effet antiprolifératif et anti-migration d'une demi-douzaine de composés issus d'un crible pharmacologique d'Inventiva, dans des lignées de cancer bronchiques non à petites cellules (CBNPC) et des lignées mésothéliales réputées pour avoir une activation de YAP. Par ailleurs, le Dr. Abreu a testé avec succès l'effet de ces composés en association avec le tramétinib dans des lignées bronchiques avec mutation de K-Ras et YAP nucléaire (lignée A549, NCI-H1999: RASSF1A méthylée, YAP majoritairement nucléaire à confluence donc activée (1)) pour récapituler de façon pharmacologique, la létalité synthétique observée par le groupe de T. Bivona. En effet, cette équipe a décrit ce phénomène au moyen d'une déplétion génétique de YAP par ARN interférence (ShRNA) et de l'inhibition simultanée de MEK par tramétinib, dans des lignées avec mutations oncogéniques de K-Ras ou B-Raf (2). Devant ces résultats préliminaires intéressants, nous avons pris la décision de sélectionner le composé CV2640 pour la suite des expériences, puisqu'il s'agissait du composé qui montrait les effets les plus constants et importants dans différentes expériences. De plus son activité biochimique était la plus importante de la série de composés identifiés par Inventiva, sur des tests réalisés par l'équipe préclinique de Inventiva, tant sur l'inhibition de la localisation nucléaire de YAP, que sur le déplacement de l'interaction YAP/TEAD en co-IP dans des lignées à forte concentration nucléaire de YAP à confluence (activité estimée à 3 μ M), dans un test de transactivation d'un plasmide rapporteur GAL4 (activité estimée à 1,5 μ M) ou encore par son effet inhibiteur de l'expression d'ARN cible de YAP dans la lignée mésothéliale H2052 (que notre équipe avait caractérisée comme ayant une voie Hippo/YAP activée par mutation de NF2 et méthylation du promoteur de la kinase LAST2 et de RASSF1A (3)).

Parallèlement à ces recherches sur les inhibiteurs de YAP, l'équipe avait commencé à développer depuis quelques années en collaboration avec l'équipe du Dr. Stéphanie Descroix de l'Institut Pierre Gilles de Gennes (IPGG, UMR168 Curie-IPGG), un système expérimental micro-fluidique visant à reconstituer *in vitro* avec des lignées, ou *ex-vivo* à partir de cellules

humaines directement isolées de tumeurs fraîches, un microenvironnement mimant bien qu'imparfaitement le microenvironnement tumoral, sur puce micro-fluidique, permettant de baptiser ce système de "cancer-on chip" (4–6). Ce type de système avait été en effet validé dans l'équipe en utilisant des cellules d'une lignée de cancer du sein HER2+ co-cultivées avec des fibroblastes associés au cancer (CAFs) du sein, et des cellules sanguines périphérique mononuclées (PBMC) de donneurs sains, la puce étant "traitée" par trastuzumab dans une première publication (6). Ces expériences ont permis de démontrer la validité de ce système expérimental pour récapituler le mode d'action du trastuzumab dépendant des cellules immunitaires, et montrer l'effet inhibiteur sur l'action du trastuzumab des CAFs. Le modèle de "cancer du poumon on chip" avait, lui, été initié par une doctorante (thèse CIFRE, Fondation Roche), Irina Veith dans le cadre d'un programme labellisé de la Fondation ARC "Lung cancer Eco-Chip" à partir de 2017, visant à la *"reconstitution sur puce, d'écosystèmes tumoraux pulmonaires, personnalisés et immunocompétents comme nouveau paradigme de test pour l'évaluation préclinique de cytostatiques ou inhibiteurs de points de contrôle immuns dans le cancer broncho-pulmonaire"*. Son travail avait pour but de développer, avec l'aide du groupe de bio-informatique de l'Université de Rome Tor Vergata (Eugenio Martinelli et Ariana Mencattini) de nouveaux algorithmes d'analyse vidéo pour mesurer automatiquement les effets cytotoxiques (apoptose en l'occurrence appréciée au moyen de rapporteurs fluorescents) sur les cellules cancéreuses humaines (poumon et sein) induits par la chimiothérapie (7). Cette méthode automatisée et brevetée appelée STAMP (spatio-temporal apoptosis mapper) va compter ces événements de mort dans la puce micro-fluidique et permet donc de cartographier l'apoptose à la fois au cours du temps d'expérience et aussi dans l'espace.

Dans ce contexte, j'ai eu l'opportunité de poursuivre le travail initié par le Dr Abreu, lors de ma thèse de sciences, et d'étudier l'impact de l'inhibition de YAP sur la chimiorésistance au paclitaxel, dans des lignées de cancer du poumon par le composé CV2640 développé par Inventiva. De même, le système de « cancer on chip » développé par l'équipe, m'a permis d'analyser l'effet cumulé de ce composé avec le paclitaxel sur des cellules cultivées en 3D, à la fois sur la lignée cellulaire A549, mais aussi sur des cellules tumorales issues de prélèvements de tumeurs fraîches de patients atteints d'un CBNPC, opérés à Bichat.

Le travail présenté dans ce manuscrit est donc le fruit de mon projet de thèse de sciences, tentant de montrer la possible implication de YAP dans la chimiorésistance acquise au paclitaxel dans des cellules de cancer pulmonaire et l'effet de réversion de cette chimiorésistance du composé CV2640 d'Inventiva sur des cellules cancéreuses pulmonaires.

Ce manuscrit est articulé en trois parties. L'introduction permet en premier lieu de faire une revue de la littérature sur le cancer pulmonaire et ses traitements médicamenteux, mais aussi sur la voie de signalisation Hippo/YAP, son implication dans la carcinogénèse et les phénomènes d'invasion tumorale, ou de transition épithélio-mésenchymateuse, en particulier dans le cancer pulmonaire. Cette introduction permettra aussi de présenter les données actuelles de la littérature sur l'intérêt potentiel du ciblage thérapeutique de YAP notamment dans la prise en charge de ce cancer. Dans une deuxième partie, les résultats obtenus au cours de ma thèse sont présentés sous la forme d'un article scientifique, qui va être soumis pour publication au journal "Cells" de facteur d'impact 2022 à 7,6. La troisième partie permettra une discussion sur les résultats obtenus et les perspectives ouvertes par ce travail expérimental.

REMERCIEMENTS

Ce travail de Thèse a été effectué au sein du laboratoire Stress et Cancer
Unité U830 Cancer, Hétérogénéité, Instabilité et Plasticité (CHIP),
Institut Curie - Inserm U830
26, rue d'Ulm
75248 Paris cedex 05 - FRANCE
Dirigée par **Fatima MECHTA-GRIGORIOU**

Sous la direction scientifique du **Professeur Gérard ZALCMAN**

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIÈRES

AVANT PROPOS	4
REMERCIEMENTS	7
FIGURES	10
TABLEAUX	11
LISTE DES ABBREVIATIONS	12
INTRODUCTION	14
A. LE CANCER PULMONAIRE	14
1. Épidémiologie	14
1.1 Incidence	14
1.2 Mortalité.....	16
2. Anatomopathologie du cancer pulmonaire	16
3. Classification TNM.....	19
4. Facteurs de risque	21
5. Facteurs pronostiques.....	23
6. Prise en charge thérapeutique	24
6.1 Stades précoces	25
6.2 Stades localement avancés (IIIA, IIIB, IIIC).....	27
6.3 Stade métastatique	28
B. LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO/YAP	37
1. Généralités	37
2. Les effecteurs terminaux YAP/TAZ.....	40
3. Voie Hippo/YAP et carcinogénèse	52
4. Voie Hippo/YAP et résistance au traitement	63
5. Inhibiteurs de la voie Hippo/YAP : nouvelle cible thérapeutique ?	71
6. Collaboration avec le laboratoire pharmaceutique Inventiva	78
C. OBJECTIFS	82
RESULTATS	84
ARTICLE: “Hippo/YAP Pathway involvement in therapeutic resistance to Paclitaxel in lung cancer” – En cours de Soumission à “Cells” (IF 7,66)	86
DISCUSSION	119
CONCLUSION	127
ANNEXES	128
ANNEXE 1 – Article « MST1/Hippo promoter gene methylation predicts poor survival in patients with malignant pleural mesothelioma in the IFCT-GFPC-0701 MAPS Phase 3 trial ». Maille E, Brosseau S, Hanoux V, Creveuil C, Danel C, Bergot E, et al. Br J Cancer. 19 févr 2019.....	128
ANNEXE 2 - CEPRO 2020-051	140
BIBLIOGRAPHIE	141

FIGURES

FIGURE 1 : Incidence et mortalité du cancer pulmonaire à travers le monde.	15
FIGURE 2 - Algorithme du traitement de 1 ^{ère} ligne des CBNPC métastatique sans addiction oncogénique.	30
FIGURE 3 – Algorithme des thérapies ciblées dans le cadre du traitement de 1 ^{ère} ligne des CBNPC métastatiques avec addiction oncogénique.....	36
FIGURE 4 - Comparaison des phénotypes de drosophiles sauvages (drosophile de gauche) ou mutées pour le gène Hpo codant la kinase Hippo (drosophile de droite). D’après Johnson and Halder, 2014 (58)	37
FIGURE 5 – Voie de signalisation Hippo	39
FIGURE 6 - Représentation schématique des domaines de YAP et TAZ, d’après Piccolo et al 2014(72).....	42
FIGURE 7 - Rôle de YAP au cours du développement pulmonaire initial, d'après Mahoney et al. (78).....	44
FIGURE 8 - La polarité médiée par Crumbs3 dirige le destin des cellules épithéliales des voies respiratoires par l'intermédiaire de l'effecteur Yap de la voie Hippo, d'après Szymaniak et al. (79).....	45
FIGURE 9 - Rôle de l'activité transcriptionnelle de YAP dans le contrôle de la ramification bronchique en interaction avec voie TGFb/Sonic Hedgehog, pour le contrôle de l'action de FGF-10, d'après Isago et al.(80))	46
FIGURE 10 - Représentation des partenaires protéiques de YAP et TAZ.....	47
FIGURE 11 - Représentation schématique de la régulation de la voie de signalisation Hippo/YAP, d’après Moya et al. 2019 (97).....	51
FIGURE 12 - Activation de YAP/TAZ et cancers	54
FIGURE 13 - Plasticité des carcinomes bronchiques à petites cellules jusqu'au sous-type YAP1. D’après Ireland AB et al. (114).....	55
FIGURE 14 - Représentation schématique des fonctions de YAP/TAZ dans la carcinogénèse.....	56
FIGURE 15 - La combinaison ITK et inhibiteur de YAP pourrait être une stratégie prometteuse.....	65
FIGURE 16 - YAP/TAZ et résistance à la chimiothérapie.....	70
FIGURE 17 - Inhibiteurs de la voie Hippo/YAP.....	72
FIGURE 18 - Interactions protéiques YAP/TAZ-TEAD1 en présence/absence du composé IV1612640	80
FIGURE 19 - Expression des principaux gènes cibles de YAP/TEAD en présence ou non du composé IV162640	80

TABLEAUX

TABLEAU 1 :8 ^{ème} Classification TNM du cancer pulmonaire.....	20
TABLEAU 2 – Résumé des membres de la voie Hippo et régulateurs en amont dérégulés dans le CBNPC D’après Lo Sardo et al. Cancers 2018 (125)	60

LISTE DES ABBREVIATIONS

ATCC : American Tissue Culture Collection
BSA : Bovine Serum Albumin
CAF : Cancer-associated fibroblast
CBNPC : Carcinome Bronchique Non À Petites Cellules
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CoIP : Co-Immunoélectrophorèse
CPC : Cancer à Petites Cellules
CTGF : Connective Tissue Growth Factor
CYR61: Cysteine-Rich angiogenic inducer 61
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EMT: Epithelial–mesenchymal transition
FBS: Fetal Bovine Serum
IASLC: International Association for the Study of Lung Cancer
ICI: Inhibiteur de Checkpoint Immunitaire
IF; Immunofluorescence
IHC: Immunohistochimie
IMC : Index de Masse Corporel
INCa: Institut National du Cancer
ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase
LATS: Large Tumor suppressor
MOB: Mps One Binder
MP: Mesotheliome pleural
MST: Mammalian Sterile 20-like kinase
NF2: Neurofibromine 2
OR: Odds Ratio
PBS: Phosphate Buffered Saline
PDL-1: Programmed Death-ligand 1
PPS: Projet Personnalisé de Soins

PS: Performans Status

RASSF: Ras ASSociation domain Family

RPMI: Roswell Park Memorial Institut

SAV: Salvador Protein

SiRNA: Small Interfering Ribonucleic Acid

STAMP: Spatio-Temporal Apoptosis MaPper

STK: Serine Threonine Kinase

TAZ: Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif

TEAD : Transcriptional Enhancer Factor

THS: Traitement Hormonal Substitutif

TSM: Taux d'incidence Standardisé Monde

VP : Verteporfine

YAP : Yes-associated Protein

INTRODUCTION

A. LE CANCER PULMONAIRE

1. Épidémiologie

1.1 Incidence

Selon les dernières estimations de *l'International Agency for Research On Cancer (IARC)*, on évalue à plus de 19 millions le nombre de nouveaux cas de cancers dans le monde en 2020 (tous sexes et âges confondus). Le cancer du poumon occupe la première place en termes d'incidence avec 11,4% de cas diagnostiqués (**FIGURE 1**)(8). Globalement, le taux d'incidence est plus important dans les pays développés possiblement en lien avec une sous-déclaration dans les pays en voie de développement et un retard de l'épidémie tabagique dans ces pays qui n'a cru significativement que depuis les années 1970. Par ailleurs, on note une forte augmentation de l'incidence chez la femme, probablement en corrélation avec l'augmentation du tabagisme féminin depuis la Seconde Guerre Mondiale.

Selon les chiffres de l'Institut National du Cancer (INCa), on estime en 2018 à 46363 le nombre de nouveaux cas de cancer pulmonaire en France métropolitaine(9). Les taux d'incidence standardisés Monde (TSM), correspondant au nombre de nouveaux cas pour 100000 habitants, sont respectivement de 50,5 chez l'homme et de 23,2 chez la femme, soit un rapport homme/femme de 2,2. En conséquence, le cancer pulmonaire est la 2^{ème} cause la plus fréquente de cancer chez l'homme (après la prostate) et la 3^{ème} chez la femme (après le cancer du sein et le cancer du côlon). L'âge moyen au diagnostic est estimé à 67 ans chez l'homme et 65 ans chez la femme.

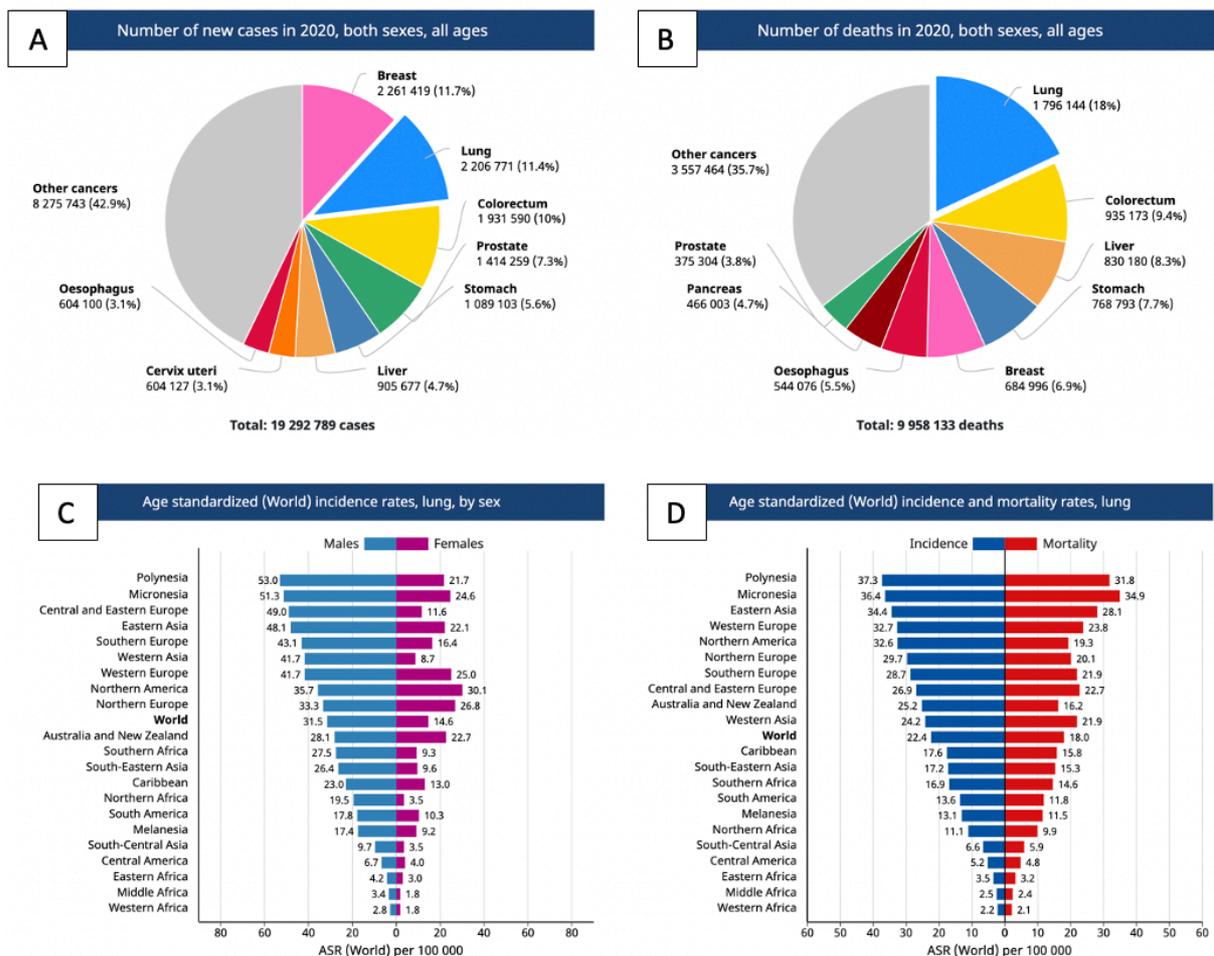


FIGURE 1 : Incidence et mortalité du cancer pulmonaire à travers le monde.

- A. Nombre de nouveaux cas de cancers, en 2020, sexes et âges confondus
- B. Nombre de décès par cancer, en 2020, sexes et âges confondus
- C. Incidence du cancer pulmonaire dans le monde, en fonction du sexe
- D. Incidence et mortalité du cancer pulmonaire dans le monde

Représentation graphique (Global Cancer) des données de Globocan 2020, disponibles en ligne [https://gco.iarc.fr/\(8\)](https://gco.iarc.fr/(8))

1.2 Mortalité

Avec presque 10 millions de décès en 2020 dans le monde, le cancer pulmonaire constitue malheureusement encore la première cause de mortalité par cancer dans le monde avec 18% des décès (**FIGURE 1)(8)**.

Selon l'INCa, 33117 des décès en France sont imputables au cancer pulmonaire en 2018, dont 22761 (soit 69%) chez l'homme et 10356 (soit 31%) chez la femme. Les taux de mortalité standardisés Monde (TSM) sont respectivement de 34,7 chez l'homme et de 14 chez la femme, avec un ratio homme/femme à 2,5. Ainsi, le cancer pulmonaire se situe au 1^{er} rang des décès secondaires à un cancer chez l'homme et au 2^{ème} rang chez la femme, talonnant le cancer du sein (mais l'ayant dépassé dans l'ensemble de l'Europe et aux USA(10).

Alors que l'incidence et la mortalité sont stables, voire diminuent chez l'homme, ce n'est pas le cas chez la femme chez qui on retrouve une mortalité en forte progression depuis les 1990. Le cancer pulmonaire occupera très certainement la 1^{ère} cause de mortalité par cancer chez la femme en France d'ici la fin de la présente décennie (9).

Même si la survie à 5 ans s'améliore au fil des décennies (de 3 % en 1989-1993, à 17 % en 2005-2010, et 20 % en 2010-2015), le pronostic du cancer pulmonaire reste globalement mauvais, et ce indépendamment de l'histologie, du stade ou du traitement. Environ 70 à 80% des cancers pulmonaires sont à l'heure actuelle diagnostiqués à des stades avancés ce qui rend compte du pronostic global péjoratif, mais un patient avec cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC) de stade I a des chances de survie à 5 ans inférieures à celles d'une patiente avec cancer du sein de stade I, ce qui témoigne de la sévérité intrinsèque de ce cancer.

2. Anatomopathologie du cancer pulmonaire

Le diagnostic de cancer pulmonaire repose sur une analyse anatomo-pathologique précise. Le pathologiste est dans une problématique d'épargne tissulaire, le diagnostic et la caractérisation moléculaire se faisant le plus souvent sur des « petits prélèvements », à savoir des biopsies bronchiques per-endoscopiques. En endoscopie, le nombre de biopsies bronchiques doit être supérieur à 5 : idéalement 5 biopsies pour le diagnostic et 5 biopsies supplémentaires pour phénotypage et génotypage (11). En cas de biopsies trans-thoraciques réalisées avec repérage tomodensitométrique pour des lésions périphériques, il est nécessaire de réaliser au moins 2 carottes, en gauge 18 et en coaxial pour permettre les analyses

histologiques et moléculaires nécessaires. La fixation des prélèvements histologiques doit utiliser le formol tamponné, évitant la dégradation des acides nucléiques ADN comme ARN. La définition anatomo-pathologique du cancer pulmonaire est absolument indispensable pour assurer une prise en charge thérapeutique adaptée, qui varie selon le sous-type histologique. En effet, la complexification récente de l'arsenal thérapeutique nécessite une identification histologique très précise, se basant sur les recommandations de la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)(12,13).

Le cancer pulmonaire se divise en 2 grandes catégories :

- **Les Cancers Broncho-pulmonaires Non à Petites Cellules (CBNPC) :** représentent la forme histologique la plus fréquente de cancers pulmonaires (85%). On décrit trois grandes sous-catégories de CBNPC :
 - L'adénocarcinome (40% des CBNPC) défini par sa différenciation glandulaire (architecture, sécrétion de mucine, PAS-diastrase positif (+), TTF1 +, le facteur de transcription TTF1 gouvernant la différenciation bronchiolaire et l'alvéolisation).
 - Le carcinome épidermoïde (30% des CBNPC) défini par une architecture et des structures d'adhérences intercellulaires proches de celles de la peau, et une expression de l'isoforme courte de p63, à savoir p40 (et une expression élevée du facteur de transcription SOX2).
 - Le carcinome indifférencié à grandes cellules (15% des CBNPC), sans différenciation ni glandulaire ni épidermoïde (TTF1 négatif (-) et p40-), mais avec parfois une expression de marqueurs neuroendocrines (chromogranine +, CD56+) qui n'en font pas cependant un carcinome neuro-endocrine à grandes cellules, entité plus rare, définie par une architecture spécifique.
- **Le Cancer à Petites Cellules (CPC) neuro-endocrine :** représente 15% des cancers pulmonaires. Il s'agit d'un cancer de haut grade de malignité avec une différenciation neuroendocrine (chromogranine+, CD56+, synaptophysine+, mais TTF1+), caractérisé aussi par des artéfacts d'écrasement sur les petites biopsies. Au plan moléculaire, ce type de cancer se caractérise par une perte d'expression de la protéine Rb (par mutation stop ou délétion), et une forte expression de TP53 (liée à des mutations faux-sens). Le travail de cette thèse ne portera pas sur ce type de cancer dont nous ne reparlerons donc plus.

La répartition histologique a considérablement évolué depuis les années 1990. Chez l'homme, le cancer pulmonaire de type adénocarcinome est devenu majoritaire depuis 2010 au détriment des épidermoïdes. Chez la femme, même si on note une nette augmentation des taux d'incidence de tous les types histologiques, l'adénocarcinome reste l'histologie majoritaire. Cette évolution est liée aux changements de mode de tabagisme, à savoir le remplacement progressif depuis les années 1960, désormais quasi complet des tabacs bruns (la fameuse "Gauloise" par exemple) à goût âcre dont faiblement inhalés, avec des carcinogènes s'impactant au niveau des éperons bronchiques proximaux, par des tabacs blonds, moins forts en goût, inhalés plus profondément jusqu'au bronches distales et alvéoles.

En cas de CBNPC localement avancés (non irradiables) ou métastatiques, il est recommandé de rechercher systématiquement l'expression de la protéine de point contrôle immunitaire *Programmed Death-ligand 1* (PDL1) sur les cellules tumorales, ou la surexpression des kinases ALK et ROS1 par immunohistochimie (IHC). De même, une recherche d'altérations moléculaires par séquençage de nouvelle génération (NGS) sur l'ADN et/ou l'ARN est désormais recommandée (ESMO/ASCO) sur les gènes EGFR, K-RAS, B-RAF, HER-2, c-MET (mutation d'épissage avec saut de l'exon 14), ALK (réarrangement par inversion d'un fragment du chromosome 2p) et ROS1 (translocation chromosomique). L'absence de tabagisme ou une durée de sevrage prolongée (plus de 10-15 ans) depuis l'arrêt du tabagisme augmentent de façon considérable la probabilité d'une altération moléculaire ciblable (EGFR, ALK, ROS1) par des inhibiteurs spécifiques de kinase désormais enregistrés en première ligne (EGFR, ALK), ou recommandés en ligne ultérieure (ROS1). Par ailleurs, des études récentes ont permis de prouver le bénéfice majeur d'une thérapie ciblée en post opératoire immédiat, avec une diminution du risque relatif de récurrence. L'essai ADAURA engage ainsi à changer de stratégie diagnostique et thérapeutique des tumeurs de stade précoce (14) par l'administration en post-opératoire pendant 3 ans d'un inhibiteur spécifique, l'osimertinib, en cas de mutation addictive oncogénique de l'EGFR sur la pièce opératoire, après quatre cures de chimiothérapie à base de sel de platine, quand celle-ci est indiquée (stades IB, II et IIIA de la 7ème classification TNM). Ainsi, la caractérisation moléculaire des tumeurs opérées de stades précoces s'impose désormais dans des essais adjuvants en cours pour les patients avec tumeur de stade précoce porteuse d'un réarrangement ALK. Par ailleurs, les patients dont la tumeur exprime le PD-L1 dans plus de 50% des cellules tumorales (sans mutation addictive EGFR ni réarrangement ALK) pourraient bénéficier d'un traitement adjuvant par anticorps anti-PD-L1, l'atezolizumab. Malheureusement, les résultats de l'essai

de phase 3 IMpower010 n'ont pas convaincus pour le moment la commission de transparence de l'HAS, alors que l'AMM européenne a été obtenue au printemps 2022 (15).

3. Classification TNM

Dans l'idée d'affiner au mieux la prise en charge thérapeutique des patients, le chirurgien français Pierre Denois a établi entre 1943 et 1952 une classification des cancers selon leur extension anatomique. Le stade TNM, adopté par la suite par l'OMS, est un facteur pronostique indépendant très fort, confirmé dans de multiples études historiques. L'IASLC (*International Association for the Study of Lung Cancer*) a publié sa dernière mise à jour en 2021 (classification TNM 8^{ème} édition). La classification TNM basée sur 3 critères (Tumor, Node, Metastasis), est une classification anatomo-clinique (radiologique). En cas de chirurgie thoracique, les patients seront reclassés en pTNM suivant les résultats histopathologiques. En cas de traitement néoadjuvant, les patients seront aussi reclassés en ypTNM selon les mêmes critères. La 8^{ème} classification TNM du cancer pulmonaire est résumée sur le **TABLEAU 1**.

A

CLASSIFICATION TNM 8^{ème} EDITION

T - Tumeur	Tx	Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.	
	T0	Absence de tumeur identifiable.	
	Tis	Carcinome <i>in situ</i> .	
	T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (c'est-à-dire pas dans les bronches souches).	
	T1a(mi)	Adénocarcinome minimalement-invasif	
	T1a	≤ 1 cm	
	T1b	> 1 cm et ≤ 2 cm	
	T1c	> 2 cm et ≤ 3 cm	
	T2	Tumeur de plus de 3 cm, mais de moins de 5 cm OU avec un quelconque des éléments suivants -envahissement d'une bronche souche quelle que soit sa distance par rapport à la carène mais sans envahissement de la carène, -envahissement de la plèvre viscérale, -existence d'une atélectasie ou pneumonie obstructive	
	T2a	> 3 cm mais ≤ 4 cm	
T2b	> 4 cm mais ≤ 5 cm		
N - Adénopathies	T3	Tumeur de plus de 5 cm et de moins de 7 cm , OU associée à un(des) nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans le même lobe , OU envahissant directement : -la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet), -le nerf phrénique, -la plèvre pariétale ou le péricarde pariétal.	
	T4	Tumeur de plus de 7 cm OU associée à des nodules tumoraux séparés dans deux lobes différents du même poumon, OU envahissant directement : -le médiastin, -le cœur ou les gros vaisseaux, -la trachée, ou la carène -le diaphragme, -le nerf récurrent, -l'œsophage, -un(des) corps vertébral(ux).	
	Nx	Envahissement locorégional inconnu.	
	N0	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.	
	N1	Métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe.	
	N2	Métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous-carénaux	
	N3	Métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scaléniques, sus-claviculaires homo- ou controlatérales.	
	Métastases	M0	Pas de métastase à distance.
		M1	Existence de métastases :
		M1a	Nodule(s) tumoral(ux) séparés dans un lobe controlatéral, ou nodules pleuraux ou pleurésie maligne ou péricardite maligne
M1b		Une seule métastase extra-thoracique dans un seul organe	
M1c	Plusieurs métastases extrathoraciques dans un seul ou plusieurs organes		

B

	N0	N1	N2	N3	M1a-b Tout N	M1c Tout N
T1a	IA-1	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1b	IA-2	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1c	IA-3	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B

TABLEAU 1 :8^{ème} Classification TNM du cancer pulmonaire

A- Classification TNM (d'après les référentiels-aristot.com)(16)

B- Stade TNM (d'après les référentiels-aristot.com)(16)

4. Facteurs de risque

Tabagisme

On estime que le tabagisme actif est responsable de 85% des cancers pulmonaires. Même si on note un infléchissement du tabagisme en France depuis 2016 (33% de fumeurs dans la population adulte en France, contre 20% en Grande-Bretagne, 15,3% aux USA et 14% en Australie), celui-ci reste de loin la première étiologie des décès par cancer en France. Le risque du cancer pulmonaire est clairement proportionnel à la durée à la puissance 4,5, et la précocité du tabagisme (laquelle induit souvent une durée plus longue), la formule précise étant: dose x durée^{4,5}. L'arrêt du tabac réduit nettement le risque de décès, sans que les courbes d'espérance de vie des fumeurs sevrés ne rejoignent jamais celles des patients non-fumeurs ("jamais fumeurs"), même si elles s'en rapprochent lorsque le sevrage tabagique est obtenu avant l'âge de 35 ans (17). L'actualisation en 2004 de l'étude des médecins britanniques suivis pendant 50 ans par Richard Doll puis Richard Peto a montré que 53% des fumeurs étaient morts à 80 ans contre 22% des non-fumeurs, avec une différence d'espérance de vie de 11 ans. La prise de conscience plus tardive en France par rapport à la Grande-Bretagne, avec des campagnes anti-tabac plus tardives et moins importantes, explique sans doute que le taux standardisé de décès par cancer bronchique / 100 000 habitants entre 35 et 44 ans, étaient encore 2,5 fois plus élevé chez l'homme en France qu'en Grande-Bretagne, et deux fois plus chez la femme en 2009 (18). L'augmentation du cancer pulmonaire chez la femme est en grande partie expliquée par l'augmentation de leur consommation depuis la Seconde Guerre Mondiale. La *UK Million Women study* a démontré une pente particulièrement abrupte de la courbe du risque relatif de décès par cancer pulmonaire chez les femmes, corrélée au nombre de cigarettes fumées par jour de 10,8 à 8 cigarettes par jour, à 22 pour 15 cigarettes par jour et 36 pour 25 cigarettes par jour (19). Par ailleurs, certains auteurs ont étudié la sensibilité aux carcinogènes des composants en fonction du sexe. Bien que cela reste discuté au plan épidémiologique, et que l'explication n'en soit pas totalement claire (contexte hormonal ?) le risque de développer un cancer pulmonaire chez la femme, à tabagisme égal, serait environ 1,5 à 3 supérieur à l'homme (20).

Même s'il est extrêmement difficile de quantifier un tabagisme passif, de nombreuses études ont confirmé qu'il existait une augmentation significative du risque de développer un cancer pulmonaire chez les non-fumeurs exposés à la fumée de cigarettes, sur leur lieu de travail ou par leur conjoint. Une méta-analyse confirme que l'inhalation de la fumée de tabac

d'autrui est une cause de cancer du poumon. En effet, l'analyse des couples de patients fumeurs/non-fumeurs permet d'établir un risque de développer un cancer pulmonaire chez les non-fumeurs à 24% avec une relation linéaire entre le nombre de cigarettes inhalées et la durée d'exposition ($p < 0.001$)(21).

Enfin, le cannabis, dont la consommation a explosé depuis le milieu des années 1970 constitue clairement un facteur de risque surajouté au tabagisme (22). En effet, la fumée de combustion du cannabis contient une concentration en hydrocarbures aromatiques polycycliques et en carcinogènes plus importants que la fumée de combustion du tabac, le cannabis augmente au moins par deux le risque de cancer pulmonaire, à tabagisme égal, avec un âge de survenue plus faible et une association fréquente à des lésions d'emphysème témoignant de sa toxicité pour les structures alvéolaires (22).

Expositions professionnelles

Selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et l'Institut national de recherche et de sécurité (INRS), le risque de développer un cancer pulmonaire en cas d'exposition professionnelle est de 14,6% (2,3% chez la femme et 19,3% chez l'homme). Même si l'amiante représente le carcinogène le plus fréquemment retrouvé (avec un risque multiplicatif avec le tabac par 7,7), d'autres facteurs doivent être impérativement être recherchés comme les radiations ionisantes, et les métaux lourds comme le nickel, l'oxyde de fer, l'arsenic, la houille, ou encore l'oxyde de fer (23). Lorsqu'une exposition professionnelle est identifiée, le médecin doit faire une demande de reconnaissance de maladie professionnelle (24).

Expositions environnementales

Le CIRC a permis d'identifier de multiples carcinogènes environnementaux, tel que le radon contenu dans les sols et murs de bâtiments des régions granitiques, ou encore les particules fines de 2,5 (PM_{2,5}) à 10 de poids moléculaire liées à la pollution atmosphérique. L'inhalation de diesel constitue à l'heure actuelle aussi un facteur de risque réel, avec un risque relatif de cancer pulmonaire induit de 1,19 (25,26).

De même, une exposition aux radiations ionisantes thérapeutiques (antécédents de radiothérapie), ou une exposition aux fumées combustibles (plaque de cuisson, chauffage) ont été décrits comme facteur de risque de cancer pulmonaire (24).

Terrain hormonal

Les hormones œstrogènes E1 et E2 pourraient constituer un réel facteur de risque de cancer pulmonaire bien qu'encore discuté. Une étude a de fait mis en évidence le risque accru de survenue de cancer pulmonaire, chez les femmes ayant bénéficié d'un traitement hormonal substitutif (THS). En cas de tabagisme seul, l'Odds Ratio (OR) de développer un cancer pulmonaire de type adénocarcinome était de 13,1 (IC95% 6,8-25,2) et de 32,4 chez les femmes ayant été traitées par THS (IC95% (15,9-665,3) ($p=0,0001$). A l'inverse, une ménopause précoce avant 40 ans et l'allaitement semblent avoir une action protectrice (27).

5. Facteurs pronostiques

Les principaux facteurs pronostiques sont liés au patient (âge, sexe, comorbidités) mais aussi au cancer pulmonaire (classification et stade TNM, histologie et statut moléculaire).

L'état général du patient mesuré par le *Performans Status* (PS) ainsi que son état nutritionnel sont des facteurs pronostiques majeurs. Le *Performans Status* représente la capacité fonctionnelle propre à chaque patient à un moment donné. Il est mesuré par deux échelles : ECOG-PS et l'indice de Karnofsky. Par ailleurs, une perte de poids supérieure à 5% en moins de 6 mois est un facteur de mauvais pronostic dans toutes les études. La coexistence de comorbidités (pathologie cardio-vasculaires, diabète, autres cancers) au moment du diagnostic est elle aussi associée à un mauvais pronostic(28). Ainsi le résultat de cette évaluation va conditionner la stratégie thérapeutique et notamment la possibilité d'une inclusion dans un essai thérapeutique.

Comme évoqué antérieurement, la classification TNM est un facteur pronostic majeur indépendant. En effet, les taux de survie sont totalement différents et la stratégie de prise en charge sera donc adaptée en fonction du stade TNM, notamment pour ce qui est de l'indication d'un traitement locorégional (chirurgie ou radiothérapie) ou pas.

Au cours des vingt dernières années, les progrès effectués dans la caractérisation moléculaire des CBNPC ont considérablement modifié le paysage des possibilités thérapeutiques. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) ciblé permet depuis le milieu des années 2010 d'obtenir une identité précise du statut mutationnel de près de 300 gènes différents (dans la plupart des panels commerciaux) de chaque tumeur. L'identification moléculaire est devenue un prérequis pour tous les CBNPC, permettant de proposer une

médecine personnalisée à chaque patient. De nombreux « drivers oncogéniques » peuvent être mis en évidence sur des prélèvements tissulaires voire sur l'ADN circulant. Ces altérations moléculaires peuvent être soit des mutations ponctuelles (EGF-R, K-RAS, B-RAF, c-MET, HER2, ...), soit des réarrangements géniques ou des translocations (ALK, ROS1, RET, NTRK, NGR1, ...) (29). Parmi eux, beaucoup donnent lieu à des AMM conditionnées (EGF-R, B-RAF, ALK, ROS1) de 1^{ère} ou 2^{ème} ligne ou des accès précoces (K-RAS, c-MET, HER2, RET) voire des essais cliniques (K-RAS, c-MET, HER2, RET, NTRK...). Par ailleurs, les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire sont à l'heure actuelle des traitements de routine chez les patients atteints d'un CBNPC avec expression tumorale de PD-L1 (au mieux importante dans plus de 50% des cellules tumorales, alors en monothérapie) ou pas (en association avec la chimiothérapie), avec une franche amélioration de leur survie globale(30). Ainsi, la recherche de l'expression du taux de PDL-1 en immunohistochimie est systématique pour tous les patients ayant un CBNPC localement avancé ou métastatique, dès le diagnostic initial.

6. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge du CBNPC varie en fonction de multiples facteurs, notamment liés au patient mais aussi en fonction du stade tumoral, du type histologique et de ses caractéristiques moléculaires. Chaque stratégie thérapeutique est discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP), et est résumée dans un projet personnalisé de soin (PPS), remis au patient lors d'une consultation d'annonce. Le patient sera alors informé de toutes les options possibles, des bénéfices attendus et des effets secondaires potentiels. Si un essai clinique peut être proposé, la présentation de cet essai est alors effectuée avec les bénéfices attendus comme les effets indésirables potentiels, l'accord ainsi éclairé du patient devant être recueilli.

6.1 Stades précoces

Traitement chirurgical

Le traitement curatif de référence du CBNPC de stade I et II reste la chirurgie d'exérèse carcinologique. Elle peut être également discutée pour d'autres stades (stade IIIA) en RCP. Elle est exceptionnellement proposée pour les stades localement avancés (stades IIIB) ou métastatiques (stades IV). La chirurgie thoracique a pour but de retirer la tumeur dans sa totalité sans effraction péroopératoire, avec marges saines micro et macroscopiques (RO), avec un curage ganglionnaire anatomique complet. A l'heure actuelle, la lobectomie reste le gold standard pour les stades I et II. Cependant, récemment plusieurs auteurs ont décrit des taux de survies identiques entre segmentectomie et lobectomie (31), pour peu que la tumeur soit périphérique (moins de 2 cm de la paroi) et de petite taille (moins de 2 cm). La segmentectomie consiste en une résection anatomique associée à un curage ganglionnaire complet. Cette méthode ne doit pas être proposée pour des tumeurs avec un envahissement ganglionnaire N1. Suite à la publication de l'essai JCOGO802, le traitement chirurgical de référence des petites tumeurs <2cm sans extension ganglionnaire, deviendra ainsi probablement la segmentectomie à court terme (32). Cet essai multicentrique japonais a comparé la segmentectomie à la lobectomie chez 1106 patients ayant une tumeur <2cm à prédominance solide accessible à une segmentectomie, majoritairement par vidéo-chirurgie. La survie globale à 5 ans apparaît significativement plus importante dans le groupe segmentectomie en comparaison au groupe lobectomie avec respectivement 94,3% et 91,1%. Cependant, les résultats concernant le risque de récurrence sont à prendre en considérations puisque ce risque de récurrence locale est estimé à 10,5% dans le groupe segmentectomie *versus* 3,5% dans le groupe lobectomie. Par ailleurs, le gain fonctionnel n'était pas à la hauteur des attentes avec seulement une différence de 3,5% entre les deux groupes.

Concernant la voie d'abord, la thoracotomie conventionnelle a fait place aux chirurgies mini-invasives de type vidéo-assistée et robot-assistée. Plusieurs études ont comparés ces deux voies d'abord chirurgicales à la thoracotomie conventionnelle et les résultats carcinologiques à long terme semblent être similaires (33,34). Ces deux techniques ont l'énorme avantage de diminuer significativement les douleurs et les complications post opératoires et la durée d'hospitalisation (35). Le chirurgien expérimenté a un rôle primordial dans l'évaluation clinique et dans le bilan pré- et péroopératoire. En dehors du bilan d'extension, les critères d'opérabilité regroupent l'âge, l'Index de Masse Corporelle (IMC),

l'arrêt de tabagisme, le *Performans Status*, et les comorbidités (fonction cardio-vasculaire et respiratoire) et la fonction respiratoire (évaluée par Exploration Fonctionnelle Respiratoire complète incluant DLCO) et cardio-vasculaire. Une chimiothérapie préopératoire est discutée au moment du diagnostic pour certains patients, et récemment l'association chimio-immunothérapie respiratoire a fait l'objet d'essais cliniques concluants laissant à penser qu'elle pourrait s'imposer rapidement dans la stratégie thérapeutique des patients avec CBNCP de stade précoce (II à IIIA) (36). La suite du traitement est systématiquement discutée en RCP avec les résultats histologiques et du pTNM. L'inclusion dans un essai thérapeutique péri-opératoire doit toujours être envisagée si cela est possible, Si l'état du patient le permet, une chimiothérapie post-opératoire doit être proposée dans les stades pII et pIII, N1 et a fortiori N2 en l'absence de traitement préopératoire, dans les 6 à 12 semaines post-opératoires, mais là encore le rôle de l'immunothérapie ou de certaines thérapeutiques ciblées est en train d'émerger en fonction du statut PD-L1 (> 50%) et EGF-R voire plus bas(15,36) .

Traitement par radiothérapie stéréotaxique

Chez les patients atteints d'un CBNPC de stade T1N0 ou T2N0, de taille <3 cm, jugés inopérables de par leur comorbidités générales ou respiratoires (VEMS<30%, cardiopathie ischémique, FEVG<40%) ou trop altérés (PS>2), la radiothérapie en condition stéréotaxique est le traitement standard. Cette radiothérapie est hypo-fractionnée, délivrée en 3 à 5 fractions (48 à 60Gy) dans un petit volume a une ambition curative au prix d'effets indésirables modérés, bien que jamais comparée directement à la chirurgie dans un essai randomisé.

Traitement médical

Suite aux résultats de l'étude ADAURA, publiée en 2020, l'osimertinib est recommandé et désormais remboursé pour une durée de 3 ans, chez les patients PS0 ou 1 ayant été opérés d'un CBNPC de stade IB, II, IIIA (7^{ème} classification TNM) avec une mutation de l'*EGFR* L858R ou une délétion de l'exon 19 (14). A 2 ans, 90% [IC95% 84%-93%] des patients du bras osimertinib et 44% [37%-51%] du bras placebo étaient en vie et sans maladie. Ainsi, la médiane de survie sans maladie n'était pas atteinte dans le groupe osimertinib (38.8-NC) et de 19,6 mois (16,6-24,5) dans le bras placebo (HR 0,17 [IC 99.06% 0,11-0,26]). Par contre les données de survie globales sont encore immatures et sont attendues avec impatience pour asseoir cette stratégie, du fait de l'efficacité de l'osimertinib en cas de mutation addictive

de l'EGFR, permettant d'envisager de traiter le patient à la rechute, stratégie dont on ne sait si elle serait équivalente au traitement adjuvant d'emblée, qui semble repousser dans le temps la récurrence sans pouvoir l'éliminer complètement comme en témoigne l'augmentation de la fréquence des récurrences à l'issue des 3 ans de traitement adjuvant, sans que l'on sache encore si elles sont dues majoritairement à des clones devenus résistants à l'osimertinib.

6.2 Stades localement avancés (IIIA, IIIB, IIIC)

Traitement chirurgical

Toute stratégie chirurgicale doit être discutée en RCP, et en particulier dans les stades localement avancés (IIIA, IIIB, IIIC) pour lesquels l'impact de la chirurgie sur la survie globale apparaît plus modeste au prix de complications plus importantes. Une résection chirurgicale ne peut être envisagée que pour les stades IIIA, en fonction de l'envahissement tumoral ganglionnaire, le plus souvent après traitement néo-adjuvant. La réalisation d'une écho-endoscopie bronchique avec ponction trans-bronchique ou d'une médiastinoscopie peuvent permettre de juger de l'envahissement ganglionnaire qui de fait pénalise la survie à long terme. Dans le cadre de tumeurs IIIA jugées techniquement résécables, une chimiothérapie préopératoire +/- post-opératoire à base de sel de platine peut être proposée. L'étude Lung-ART n'a pas, par contre, permis de montrer de bénéfice significatif de la radiothérapie sur la survie globale et la survie sans rechute liée au cancer, des patients atteints d'un cancer pulmonaire résécable chirurgicalement mais N2, bien qu'elle diminue de moitié le risque de rechute locale (37), au prix d'une sur-toxicité notamment cardiaque.

Traitement par radio-chimiothérapie

En cas de tumeur IIIA non résécables ou de stade IIIB/IIIC, le traitement de référence par radiochimiothérapie concomitante peut être proposé, si l'état du patient le permet (<70 ans, sans comorbidité, PS0 ou 1). Une chimiothérapie à base de sel de platine est donc associée à une radiothérapie conformationnelle à une dose de 66 Gray par fractions de 1,8 à 2 Grays sur 6 semaines et demie. La radiothérapie séquentielle peut être proposée chez les patients fragiles, âgés, ou PS>1. En l'absence de contre-indication, une immunothérapie par Durvalumab peut être administrée pour les patients avec CBNPC exprimant le PDL1 à plus

de 1% dans le cadre de l'AMM ou sans expression de PD-L1 dans le cadre d'un accès précoce, dans les 42 jours après la fin de la radiothérapie, au mieux dans les 21 jours, pour une durée de 12 mois, selon le schéma de l'essai de phase 3 PACIFIC qui a montré une augmentation de la survie globale à 5 ans de 10% par rapport au placebo (43 vs. 33%), et de 14% de la survie sans progression à 5 ans (33 vs. 19%) au prix d'un surcroît de toxicité immuno-médiée modeste (38) (39). Un scanner thoracique doit être cependant être réalisé afin d'éliminer une pneumopathie radique sévère qui contre-indiquerait cette immunothérapie adjuvante.

6.3 Stade métastatique

Sans anomalie moléculaire addictive

Le traitement systémique de première ligne des patients atteints d'un CBNPC métastatique, sans addiction oncogénique a littéralement été bouleversé depuis quelques années. En effet, l'utilisation des inhibiteurs de checkpoints immunitaires (ICI) représente une réelle modification de paradigme dans la stratégie thérapeutique. Ce traitement, en ne ciblant plus la cellule tumorale mais le système immunitaire de l'hôte, permet de restaurer une réponse immunitaire lymphocytaire durable. Avant l'émergence de l'immunothérapie, l'algorithme de la stratégie thérapeutique reposait sur une chimiothérapie intraveineuse à base de sel de platine associé au pemetrexed pour les non-épidermoïdes ou un taxane pour les épidermoïdes. Depuis 2015, l'offre thérapeutique s'est largement étoffée et permet aux patients d'avoir des perspectives de survie globale nettement plus encourageantes. De fait 32% et 22% des patients avec expression tumorale de PDL1 supérieure à 50%, sont vivants à 5 ans, dans l'actualisation des essais Keynote-024 et Keynote-042 respectivement (40,41). De même dans les essais de chimio-immunothérapie près d'un tiers des patients, quelque soit le niveau d'expression tumoral du PD-L1 sont vivants à 3 ans, plus précisément 31,3% des patients avec CBNPC non-épidermoïde dans l'essai Keynote-189 (42) et 29,7% avec épidermoïdes dans l'essai Keynot-407 (43). Enfin un quart des patients sont vivants 3 ans après avoir reçu une double immunothérapie anti-PD-1 et anti-CTLA-4, soit 27% dans l'essai CheckMate-9LA, ou à même à 5 ans dans l'essai CheckMate-227 avec un taux de survie à 5 ans de 24% (44).

L'algorithme de la prise en charge thérapeutique de 1^{ère} ligne des patients atteints d'un CBNPC métastatique sans addiction oncogénique est donc résumé dans la **FIGURE 2** :

Protocoles thérapeutiques pour les CBNPC non épidermoïdes, métastatique, PS0 ou 1, sans addiction oncogénique :

- Si PDL-1 >50% :

Pembrolizumab en monothérapie 200mg/3sem (ou 400mg/6sem) (d'après les résultats de KEYNOTE 024 et 042) (45,46).

- Quel que soit le taux de PDL-1 :

Association chimio-immunothérapie : Platine (cisplatine 75 mg/m² ou carboplatine AUC 5) - pemetrexed (500 mg/m²) – pembrolizumab 200mg IV J1-22 pour 4 cycles ; suivi d'une maintenance par pemetrexed et pembrolizumab (200mg/3sem ou 400mg/6sem) jusque 35 cycles , ou progression, ou toxicité inacceptable (Keynote 189) (47)

Protocoles thérapeutiques pour les CBNPC épidermoïdes, métastatique, PS0 ou 1, sans addiction oncogénique :

- Si PDL-1>50% :

Pembrolizumab 200mg IV J1-22 (ou 400mg/6sem)

- Quel que soit le taux de PDL-1 :

Association chimio-immunothérapie : Carboplatine (AUC 6), paclitaxel (200mg/m²), et pembrolizumab 200mg IV J1/J22 pour 4 cycles suivi d'une poursuite du pembrolizumab 200mg/3 semaines ou 400mg/6semaines pour un total de 2 ans, ou progression, ou toxicité innacceptable.

La combinaison d'une double immunothérapie anti-CTLA-4 ipilimumab et anti-PDL-1 nivolumab avec la chimiothérapie a été évaluée *versus* chimiothérapie dans l'essai CheckMate 9LA, ainsi que mentionné plus haut dans les CBNPC de toutes histologies. La chimiothérapie était administrée en concomitance pendant 2 cycles puis était arrêtée, pour limiter les potentielles progressions précoces sous immunothérapie sans augmenter outre mesure la toxicité cumulative liée à la chimiothérapie (48). La survie à 2 ans était significativement supérieure dans le groupe double immunothérapie/chimiothérapie que dans le groupe placebo et ce indépendamment du niveau d'expression de PD-L. Le remboursement

de cette combinaison approuvée par l'Agence Européenne du Médicament n'a pas été encore validé en France.

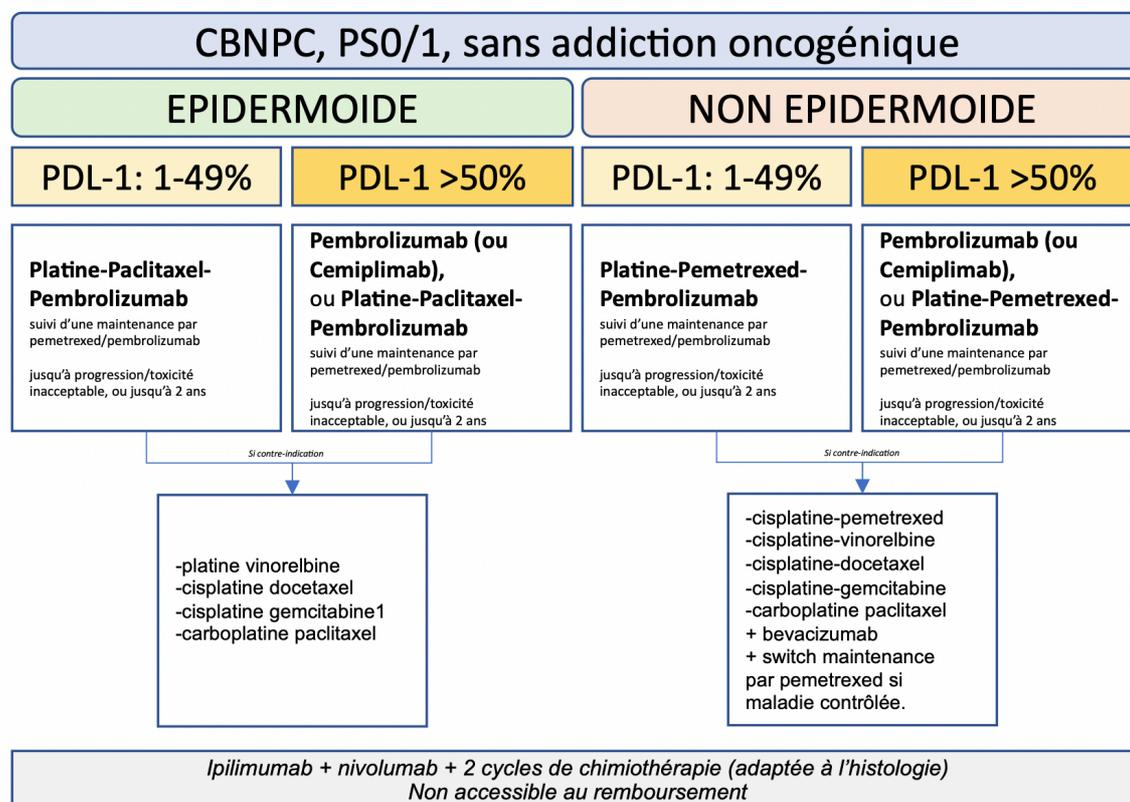


FIGURE 2 - Algorithme du traitement de 1^{ère} ligne des CBNPC métastatique sans addiction oncogénique.

Avec anomalie moléculaire

La découverte des addictions oncogéniques dans le CBNPC non-épidermoïdes a permis le développement de multiples thérapies ciblées permettant une amélioration spectaculaire de la survie globale de ces patients ainsi qu'une meilleure qualité de vie en comparaison avec la chimiothérapie. La caractérisation moléculaire est donc indispensable pour tous les patients atteints d'un CBNPC non épidermoïde métastatique, fumeur ou non, même si la fréquence de ces altérations est plus importante (hormis K-RAS) chez les jamais fumeurs ou les ex-fumeurs sevrés depuis plus de 10-15 ans. Actuellement, il existe une dizaine de cibles moléculaires identifiées. Les recommandations les plus récentes préconisent de

rechercher plutôt un panel d'altérations moléculaires grâce à un NGS ciblé, par souci d'économie du bloc histologique inclus en paraffine, plutôt que de faire des recherches unitaires séquentielles, ce qui a pu être initialement suggéré devant le caractère exclusif les unes avec les autres de ces altérations moléculaires addictives mais contribue à épuiser le matériel histologique et à allonger les délais des analyses. La recherche d'ADN tumoral circulant prend actuellement beaucoup d'ampleur car il s'agit d'un outil simple, non invasif et rapide puisque nécessitant pas d'extraction de matériel inclus en paraffine, permettant de diagnostiquer certaines anomalies moléculaires rapidement ou de suivre l'apparition de mutations de résistance sous traitement ciblé. Les principales altérations moléculaires et leurs thérapies ciblées sont décrites succinctement ci-dessous. L'algorithme de la prise en charge de 1^{ère} ligne des patients avec un CBNPC métastatique et addiction oncogénique est résumé dans la **FIGURE 3**.

K-RAS

La mutation K-RAS est retrouvée chez environ 25% des patients atteints d'un adénocarcinome pulmonaire métastatique, plus fréquente chez les patients occidentaux (30%) qu'Asiatiques (15-20%), plutôt fumeurs. L'essor très récent du sotorasib, inhibiteur direct covalent spécifique de la protéine K-RAS avec mutation G12C a permis de redonner de l'espoir à cette cohorte de patients jusqu'alors laissés pour compte des thérapies ciblées. L'essai de phase 1-2 mono-bras CodeBreak 100 a confirmé l'intérêt du sotorasib (960mg per os) en 2^{ème} ligne en cas de mutation K-RAS G12C avec un taux de réponse objective 37,1 %, une médiane de survie sans progression de 6,8 mois, et une médiane de survie globale 12,5 mois. L'enregistrement a été obtenu aux États-Unis en 2^{ème} ligne après doublet de chimiothérapie à bas de sel de platine, et le sotorasib est actuellement disponible en accès précoce en France. L'adragrasib est le 2^{ème} inhibiteur en cours de développement en attendant des molécules de 2^{ème} génération, et surtout des inhibiteurs dirigés contre d'autres mutations K-RAS comme la G12D voire des inhibiteurs à plus large spectre mutationnel.

EGF-R

En cas de mutation de l'EGF-R, il est désormais recommandé de débiter dès la 1^{ère} ligne un traitement par Osimertinib (Inhibiteur Tyrosine Kinase (ITK) de 3^{ème} génération). L'essai FLAURA, comparant l'osimertinib à un traitement par ITK de 1^{ère} génération (erlotinib ou gefitinib, eux-mêmes supérieurs à la chimiothérapie) en 1^{ère} ligne, chez les patients présentant une délétion dans l'exon 19 ou une mutation L858R dans l'exon 21, a en

effet montré une amélioration significative et impressionnante de la survie sans progression (18,9 mois vs 10,2 mois ; HR=0,46 [0,37-0,57] ; $p<0.001$) comme de la survie globale (38,6 mois vs 31,8 mois ; HR=0,799 (0,641-0,957) ; $p=0,0462$) en faveur du bras osimertinib (49), alors que la tolérance apparaît remarquable, notamment au plan cutané de par une meilleure sélectivité sur le récepteur muté que sur le récepteur sauvage.

ALK

Même s'ils sont efficaces après progression sous traitement de première ligne par l'inhibiteur historique de ALK, le crizotinib, l'alectinib et le brigatinib, inhibiteurs de ALK de 2^{ème} génération, sont désormais les traitements standards de 1^{ère} ligne des patients ayant un CBNPC métastatique et un réarrangement ALK, par inversion d'un fragment du chromosome 2p porteur du gène ALK. L'alectinib a démontré une efficacité supérieure au crizotinib en première ligne en termes de taux de survie à 4 ans de 64,5% (IC95% 55,6-73,4) dans le bras alectinib contre 52,2% dans le bras crizotinib (50,51). L'étude ALTA-1L a elle aussi comparé le brigatinib au crizotinib chez des patients naïfs de traitement par ITK (52). Le HR pour la survie sans progression était de 0,49 (IC95% 0,33-0,74, $P<0,001$) pour une médiane de survie à 9,8 mois dans le bras crizotinib mais non-atteinte dans le bras brigatinib. Le taux de survie sans progression à 1 an était de 67% (IC95% 56-75) dans le bras brigatinib contre 43% (IC95% 32-53) dans le bras crizotinib. L'efficacité spectaculaire de ces deux molécules sur les métastases cérébrales, fréquentes dans ces tumeurs réarrangées ALK, de par une bien meilleure diffusion intracérébrale et une faible affinité pour les transporteurs d'efflux actifs (la Pgp notamment) ont participé à leur indication de première ligne. Ainsi, la survie sans progression intra-crânienne était très supérieure dans le bras brigatinib par comparaison au bras crizotinib (HR=0,27 [IC95% 0,13-0,54]) avec une tolérance remarquable comme celle de l'alectinib.

L'inhibiteur de 3^{ème} génération lorlatinib s'est lui aussi comparé au crizotinib en première ligne, montrant à nouveau une nette supériorité avec 63,5% de survie sans progression à 3 ans contre 18,9% au crizotinib et un HR à 0,27 [IC95% 0,18-0,39], $p< 0.001$) (53). L'efficacité cérébrale du lorlatinib s'est avérée elle aussi spectaculaire avec 92,3% de patients sans progression cérébrale à 3 ans contre 37,7% au crizotinib, l'incidence cumulée de progression cérébrale étant de 2,8% à 1 an contre 33,2% pour le crizotinib, donnant lieu à un HR étonnant de 0,06 de progression intra-cérébrale ou décès par rapport au crizotinib. La tolérance du lorlatinib avec des effets neuro-psychiques et cognitifs, des prises de poids et dyslipidémies pénalisent cependant cette molécule dont le remboursement en première ligne après son

enregistrement européen est en attente en France. Nous reviendrons plus loin sur son spectre d'activité sur les clones porteurs de protéines ALK mutées qui émergent sous inhibiteur de 2^{ème} génération, responsables de résistances acquises.

ROS1

Le crizotinib a une AMM européenne mais n'est pas remboursé en première ligne, alors qu'il l'est en 2^{ème} ligne, en cas de réarrangement de ROS1 (54). Le Lorlatinib a une activité importante sur les cellules cancéreuses avec translocation ROS1, mais n'a pas été développé dans cette indication. De nouvelles molécules de 4^{ème} génération comme celle développée par le laboratoire Nuvalent sont actives sur ROS1 mais sont en cours de développement.

BRAF V600E

L'association Dabrafenib et Trametinib, comme dans le mélanome, a montré son efficacité en première et en seconde ligne de traitement chez les patients avec un CBNPC et mutation oncogénique BRAF V600E (55). Cette association est désormais disponible et remboursée en France pour le traitement des patients adultes en 2^{ème} ligne de traitement et plus, après échec de la chimiothérapie et/ou immunothérapie.

Résistances aux thérapeutiques ciblées

L'efficacité spectaculaire des thérapeutiques ciblant des anomalies moléculaires addictives, avec des réponses majeures voire subtotaux, se traduit par des médianes de survies sans progression jamais observées jusqu'alors sous chimiothérapie pour des CBNPC métastatiques, de 19 (osimertinib) à 36 mois (alectinib et lorlatinib) mais ne doit pas faire oublier que l'émergence de clones résistants apparaît inéluctable avec trois mécanismes principaux de résistance :

- un mécanisme de "bypass" court-circuitant la kinase ciblée et rendant la tumeur partiellement indépendante de la kinase mutée ciblée :

- par la sélection d'un clone présentant, en plus de la mutation initiale une activation des voies de signalisation en aval *via* une autre tyrosine kinase que celle inhibée par l'inhibiteur de kinase (EGF-R, ALK ou autre) par amplification génique de gènes codant pour ces autres kinases, HER-2, HER-3, c-MET ou IGF1-R, qui peuvent donc alors être ciblées par un autre inhibiteur spécifique;

- par la sélection d'un clone avec acquisition de mutations d'aval à la kinase ciblée (mutation K-RAS, PI-3K, délétion de PTEN, voire fusion Ret ou NTRK en plus de la mutation initiale, qui peuvent donc alors ciblées par un autre inhibiteur spécifique;
- par la sélection d'un clone, conservant la mutation addictive initiale mais présentant une transformation phénotypique d'adénocarcinome en épidermoïde *via* l'amplification du facteur de transcription SOX2, en carcinome à petites cellules par mutation inactivatrice de TP53 conjuguée à une mutation inactivatrice ou délétion du gène suppresseur Rb, ou encore en une tumeur très indifférenciée, avec phénotype mésenchymateux, du fait d'une transition épithélio-mésenchymateuse induite par des changements de programme transcriptionnel pouvant passer par les voies Wnt/caténine ou YAP/Hippo ce que nous reverrons ultérieurement dans ce dernier cas.

- Un mécanisme mutationnel dépendant encore de la kinase mutée ciblée par l'inhibiteur, par la sélection d'un clone présentant, en plus de la mutation addictive initiale, une mutation dite de résistance siégeant dans le site de liaison de l'ATP, entraînant un encombrement stérique réduisant l'affinité de l'inhibiteur de kinase pour ce site actif, au profit de l'ATP. Ces mutations sont en nombre limité, pour l'EGFR (principalement T790M acquise sous ITK de première génération, ou C797S acquise sous Osimertinib). Elles sont plus nombreuses pour ALK, sous ITK de 2^{ème} génération sur lesquelles le lortanib est efficace.

- mécanisme totalement indépendant de la kinase mutée par la sélection d'un clone qui ne présente plus la mutation activatrice initialement ciblée, sur lequel il n'y a donc plus de thérapie ciblée active.

La connaissance de ces mécanismes de résistance nécessite donc une stratégie de re-biopsie sur les sites métastatiques progressifs, qui permet de diagnostiquer un changement d'histologie conditionnant une chimiothérapie adaptée en cas de carcinome micro-cellulaire, quand la recherche de mutations de résistance dans le sang périphérique ne le permet pas. La découverte de ces mécanismes de résistance aux thérapeutiques ciblées témoigne donc de la grande plasticité des cancers bronchiques sous pression thérapeutique, qui peut bien sûr s'observer aussi sous chimiothérapie, mais aussi de la plasticité des cellules tumorales contrôlée par des programmes transcriptionnels adaptatifs.

Une approche alternative pour combattre ces résistances secondaires est la stratégie développée par le MASTER-protocole de l'IFCT qui vise à associer dès la première ligne, à

l'instar de la chimio-immunothérapie des CBNPC sans mutation addictive, la chimiothérapie aux traitements ciblés adapté à chaque altération moléculaire (EGFR, ALK, ROS1, B-RAF). Bien que les mécanismes de résistance à la chimiothérapie aient été peut-être moins étudiés au plan moléculaire que ceux de la résistance aux traitements ciblés, une littérature déjà ancienne a identifié la surexpression des pompes à efflux de la famille Pgp (MDR1, MRP...) dans les résistances aux sels de platine, comme celle de l'isoforme neuronale et embryonnaire TUBB3 de la bêta-tubuline comme mécanisme de résistance aux drogues interagissant avec le cytosquelette de tubuline (vinca-alcaloïdes, taxanes...) (56) la substrat moléculaire, la régulation transcriptionnelle de ces phénotypes d'expression reste mal connus. Il s'agit donc de mécanismes différents, en apparence, de ceux de la résistance aux thérapeutiques ciblées, et la pari du MASTER Protocole, en associant des traitements d'action différentes, pour lesquels les mécanismes de résistance seraient différent, est de diminuer rapidement le volume tumoral, afin de rendre statistiquement moins probable l'émergence de clones résistant, reprenant en celà le principe des association d'antibiotiques dans la tuberculose, dans le but de retarder sinon supprimer l'émergence de la résistance. Nous reviendrons plus loin dans cette thèse sur la résistance aux taxanes et le rôle de la voie de contrôle transcriptionnel YAP/Hippo.

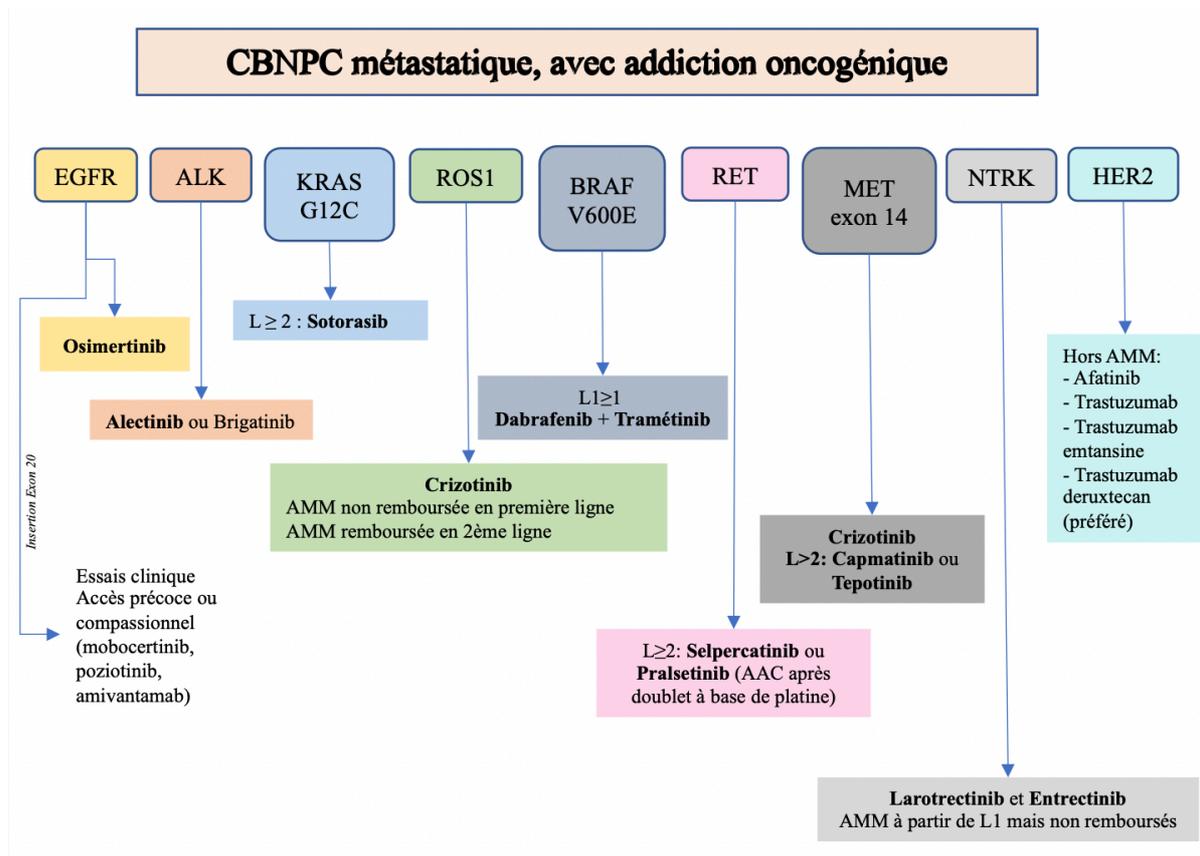


FIGURE 3 – Algorithme des thérapies ciblées dans le cadre du traitement de 1^{ère} ligne des CBNPC métastatiques avec addiction oncogénique

B. LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO/YAP

1. Généralités

La recherche sur l'homéostasie cellulaire et sur la régulation de la taille des organes a permis d'aboutir à la découverte du gène suppresseur de tumeur *Warts* chez la drosophile, codant pour une kinase jouant un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération tissulaire (LATS1/2 chez le mammifères) (57).

La voie de signalisation Hippo, qui tire son nom de la kinase centrale de la cascade « Hippo » (dont l'homologue est MST chez le mammifère) – a initialement été identifiée et caractérisée chez la *Drosophila Melanogaster*. Les mutations inactivatrices de « Hippo » chez la drosophile induisent une hyperplasie diffuse des tissus responsables d'un phénotype particulier des drosophiles mutées, dont la tête hypertrophiée ressemble alors à celle d'un hippopotame.

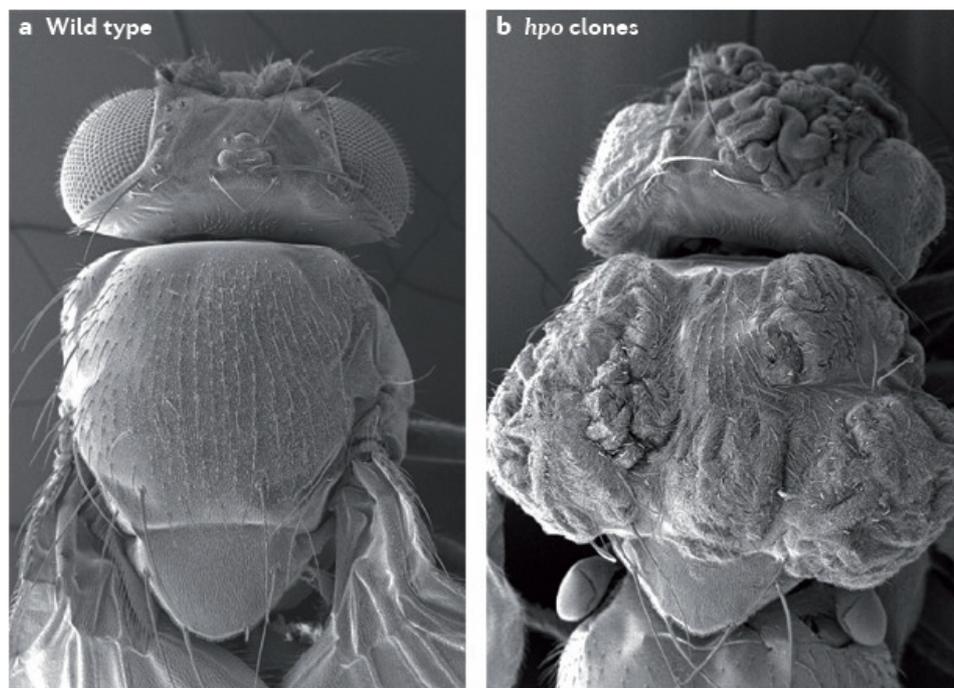


FIGURE 4 - Comparaison des phénotypes de drosophiles sauvages (drosophile de gauche) ou mutées pour le gène Hpo codant la kinase Hippo (drosophile de droite).
D'après *Johnson and Halder, 2014 (58)*

Cette voie a été conservée tout au long de l'évolution notamment pour son rôle dans la régulation de la taille des organes au cours du développement embryonnaire, via le contrôle de la prolifération cellulaire, de l'apoptose et de l'autophagie (59). Même si « Hippo » et Warts ont été les premiers membres de la voie à être caractérisés, il semblerait que la plupart des autres acteurs de cette cascade, hautement conservés au cours de l'évolution entre les différentes espèces, soient de véritables suppresseurs de tumeurs (60–63). L'effecteur terminal *Yorkie* (YAP chez les mammifères), a été découvert plus tardivement (64) et constitue lui, plutôt un oncogène, inhibé par la mise en jeu de cette cascade en amont, bien que dans certaines situations physiologiques et contextes cellulaires, une action suppressive de tumeurs ait aussi été attribuée à YAP, par une boucle négative de régulation, en induisant la transcription de ses régulateurs négatifs tels LATS (65) ou en induisant par son interaction avec p73 l'apoptose induite par des dommages de l'ADN (66).

Bien que hautement conservée au cours de l'évolution, la voie de signalisation Hippo/Yap s'est largement complexifiée chez le mammifère (67). Elle peut être subdivisée en 3 sous-groupes de protéines :

- **Des régulateurs**, souvent localisés au niveau des jonctions cellulaires, correspondant souvent à des protéines cytosquelettiques ou membranaires, dont certaines régulent la polarité apico-dorsale, l'adhésion à la matrice ou l'adhésion intercellulaire. Ces protéines régulatrices sont pour certaines codées par des gènes suppresseurs de tumeur tels NF2/Merlin (membre de la famille Ezrine/Radixine/Moesine = ERM), ou encore RASSF1A dont le gène est situé sur le chromosome 3p21 fréquemment et précocement délété au cours de la carcinogénèse bronchique. Elles agissent **en amont** et régulent :
 - **Des kinases et leurs protéines adaptatrices** qui constituent le cœur de cette cascade de signalisation. Elles s'activent par cascades de phosphorylations.
 - ◇ MST1 (aussi connue sous le nom STK4) et MST2 (STK3), homologues mammifères de la kinase Hippo chez la drosophile. Elles sont associées à leur protéine chaperonne / adaptatrice SAV 1 (WW45 chez la drosophile).
 - ◇ LATS 1 et 2 (Large Tumor Suppressor Kinase 1 et 2), homologues de la kinase Warts chez la drosophile, associées à leur protéine chaperonne / adaptatrice MOB1 et 2 et leurs proches homologues NDR1 & 2 (Nuclear-Dbf2-Related ou STK38 et STK38L).
1. **Les effecteurs terminaux de cette cascade**, les paralogues YAP (Yes-associated protein) et TAZ (Transcriptional Co-Activator with PDZ-binding motif), homologues de *Yorkie*

chez la drosophile, qui sont des cofacteurs transcriptionnels, capables de par leurs interactions avec certains facteurs de transcription (principalement TEAD 1-4) de réguler, moduler l'activation de gènes impliqués majoritairement dans la motilité, la croissance, la prolifération cellulaire et la régulation négative de l'apoptose.

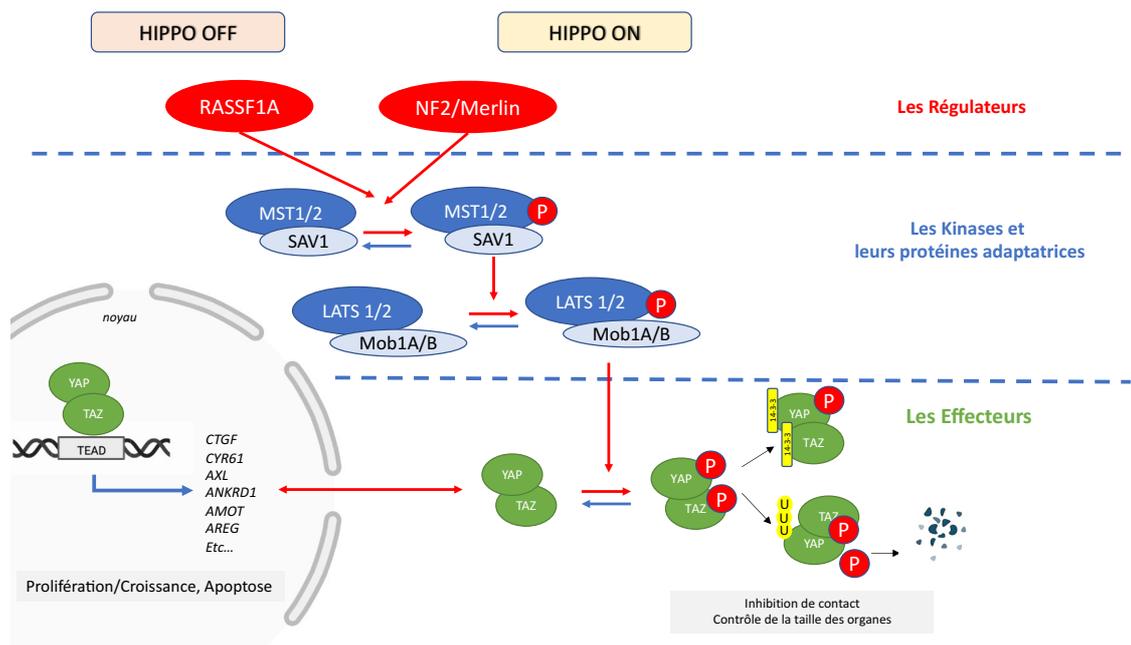


FIGURE 5 – Voie de signalisation Hippo

Ce schéma a été dessiné par mes soins à partir de *Donninger et al.* et *Bae et al.* (68,69)

La voie Hippo comprend :

- Des régulateurs (en rouge) qui agissent en amont de la voie Hippo
- Des Kinases et leurs adaptateurs (en bleu) : s'activant par une cascade de phosphorylations réciproques
- Des effecteurs terminaux (YAP/TAZ) (en vert) en aval de la voie Hippo, qui après phosphorylation sur les Ser127 et Ser89, sont séquestrés dans le cytoplasme par la protéine 14.3.3

Lorsque la voie Hippo est activée (« Hippo ON »), la sérine-thréonine kinase MST1/2 se fixe à sa protéine adaptatrice SAV1 pour former un hétérodimère actif, phosphorylant alors LATS1/2 liés aux chaperonnes MOB1/2, qui phosphorylent à leur tour les effecteurs YAP et TAZ. La phosphorylation de YAP et TAZ inhibe leur action de modulateur transcriptionnel, soit par séquestration cytoplasmique (association aux protéines 14-3-3 par exemple), soit par induction de leur dégradation par le protéasome (phosphorylation supplémentaire par la caséine kinase CDK1 et ubiquitinylation par l'ubiquitine ligase SCF E3). Cette régulation est à la base de l'inhibition de contact caractérisant les cellules épithéliales normales, alors que cette propriété est rapidement perdue au cours du processus de transformation cancéreuse. À l'inverse, lorsque la voie Hippo est inactive (« Hippo OFF »), YAP et TAZ, non phosphorylés, sont transloqués dans le noyau où ils modulent l'activité de facteurs de transcription, notamment TEAD-1-4, VGLL, RUNX2...*etc.*

Les principaux membres de la voie de signalisation Hippo sont donc repartis en 3 groupes de protéines : les régulateurs agissant en amont, les kinases (MST1/2, LATS1/2 et NDR1/2) et leurs protéines adaptatrices (SAV1 et Mob1 A/B) constituant le cœur de la voie, et les effecteurs terminaux YAP/TAZ (70). De nombreuses études ont permis de comparer les modes d'action et d'identifier les homologues entre la drosophile et les mammifères. Ainsi, MST1/2 correspondent aux kinases homologues chez le mammifère de Hippo, LATS1/2 de Warts, et Mob de Mats et Sav1. Enfin *Yorkie* semble être l'équivalent des effecteurs terminaux YAP et TAZ. Avec 76% d'homologie entre elles, MST 1 et 2 sont les plus décrites dans la littérature.

2. Les effecteurs terminaux YAP/TAZ

Généralités

Le cofacteur transcriptionnel YAP (Yes associated protein) a été identifié et caractérisé en 1995 comme interagissant avec la Src kinase c-Yes, via un domaine d'interaction SH3 (70). TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ binding motif) a été identifié plus tardivement en 2000, comme effecteur terminal interagissant avec la protéine 14-3-3 et possédant un domaine d'interaction avec un motif PDZ (71). Ces deux protéines jouent un rôle majeur dans la voie de signalisation Hippo en régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la

prolifération et la croissance cellulaire. Le gène YAP situé sur en 11q22 génère deux isoformes YAP1 et YAP2 avec respectivement 454 et 488 acides aminés. Le gène WWTR1, situé en 3q25, n'entraîne la synthèse que d'une seule protéine WWTR1, que l'on appelle plus communément TAZ. Ces deux effecteurs terminaux présente des structures similaires à 46% : pour YAP deux domaines d'interaction de type WW (domaine protéique interagissant avec le motif PPxY), 1 seul pour TAZ, des sites de liaisons TBD (TEAD binding domaine) en région N-terminale, un site de liaison aux chaperonnes 14-3-3 centré par la Sérine 127 (89 dans TAZ), un domaine SH3 (reconnaissant des motifs poly-prolines), un domaine coiled-coil central, et un domaine improprement appelé de transactivation (TAD) puisque YAP/TAZ n'interagissent pas directement avec l'ADN, et centré par la tyrosine 357, des motifs PDZ-binding en C-terminal (**FIGURE 6**) (72). Ces domaines d'associations leurs permettent d'interagir avec une vingtaine de partenaires, dont beaucoup sont communs à YAP et TAZ. LATS1/2 entraîne la phosphorylation des serines 127 de YAP et 89 de TAZ. Ces effecteurs sont alors pris en charge par le complexe 14.3.3, puis séquestrés dans le cytoplasme (73). Lorsque LATS phosphoryle les serines 381 de YAP et 311 de TAZ, les effecteurs terminaux sont alors dégradés par ubiquitination (60). La phosphorylation de la tyrosine 357 de YAP (initialement décrite sous l'effet de la Src kinase YES) est nécessaire à l'activation de YAP dans le noyau, c'est à dire à sa capacité de lier ses partenaires physiologiques, des facteurs de transcription.

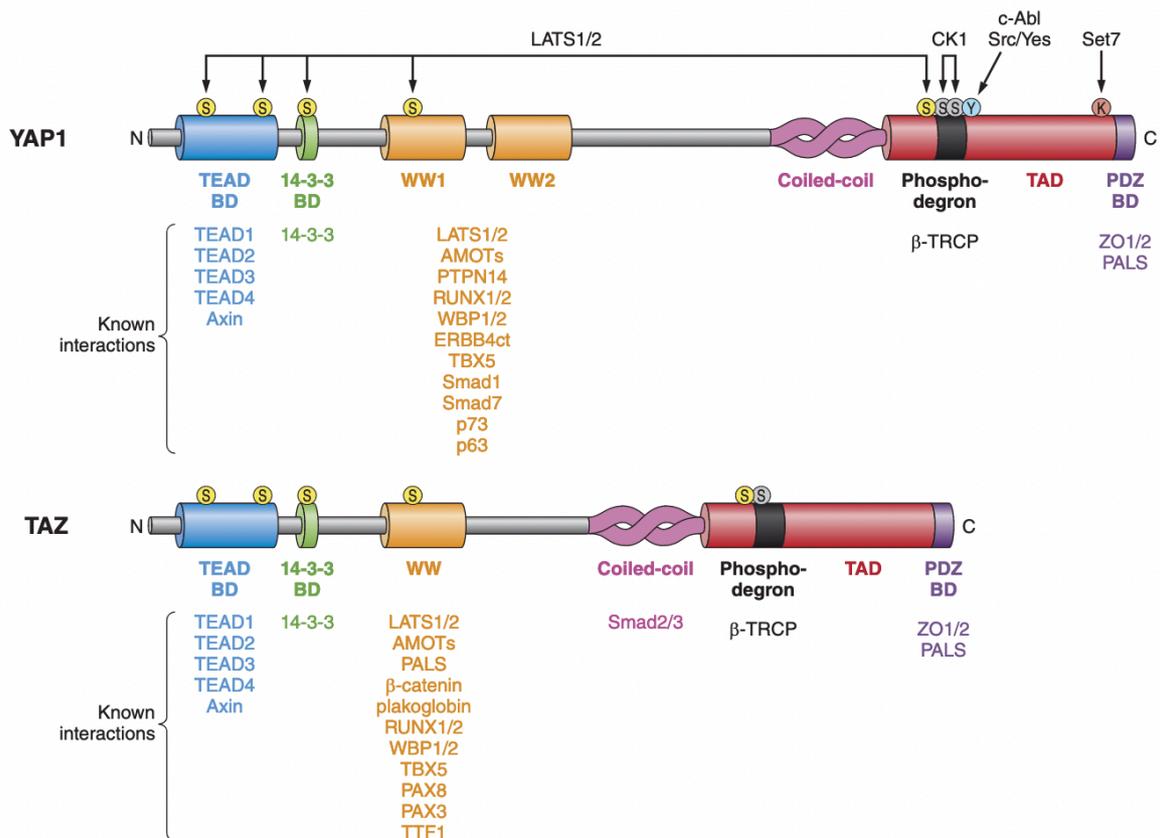


FIGURE 6 - Représentation schématique des domaines de YAP et TAZ, d'après Piccolo et al 2014(72)

L'interaction de *Yorkie* (homologue de YAP) avec Warts (homologues de LATS1/2) en 2005 a permis de dessiner le lien entre la voie de signalisation Hippo et la régulation transcriptionnelle qui en découle. Comme évoqué antérieurement, la surexpression de *Yorkie* entraîne une prolifération tissulaire chez la drosophile, permettant d'identifier cette voie de signalisation comme essentielle dans la régulation de la taille des tissus et des organes (64). YAP et TAZ jouent un rôle majeur dans l'embryogénèse et l'organogénèse. En effet, plusieurs études ont révélé que l'inactivation de YAP entraînait la mort des embryons à 8,5 jour du début du développement (74). Les modèles murins *ko* pour TEAD1/2 avaient un phénotype assez similaires à ceux obtenus lors du *ko* de YAP (75). L'inactivation de TAZ entraîne des sévères malformations in utero (malformations pulmonaires et rénales) ainsi qu'une augmentation significative de la mortalité (76). La voie Hippo semble être un facteur clé dans

la détermination des cellules en trophoctoderme. Dans l'embryon, les différences de positionnement des cellules permettent l'activation de cette voie. Il semblerait que YAP soit exprimée au niveau nucléaire à partir du stade 4 cellules et que TEAD 1, 2 et 4 soient exprimés à partir du stade 8 cellules. La voie Hippo (en collaboration avec d'autres comme la voie Notch) agit dans l'embryon pré-implantatoire, pour favoriser l'expression de CDX2 et permettre la différenciation du tropho-ectoderme (77). Dans l'embryon, l'expression du transcrit Sox2 est retrouvée de manière importante et notamment dès un stade précoce. La régulation de Sox2 au sein des blastocytes est modulée par la voie Hippo. *Mahoney et al.* ont notamment apporté la preuve que YAP, était un régulateur clé dans le développement pulmonaire (78). En effet, il semblerait que lorsque les tubules épithéliaux se forment et se ramifient, une translocation ("switch") nucléocytoplasmique de la localisation de YAP est observé et marque la limite entre les compartiments des voies aériennes conductrices et le poumon distal impliqué dans les échanges gazeux. Dans cette zone de transition, Yap spécifie un programme transcriptionnel qui contrôle l'expression de Sox2 et génère finalement l'épithélium différencié des voies aériennes. En l'absence de YAP, les progéniteurs épithéliaux sont incapables de répondre correctement aux signaux locaux induits par le TGF- β et de contrôler les niveaux d'expression et la distribution de Sox2 pour former les voies respiratoires. Les niveaux et la localisation subcellulaire de YAP influencent également de façon marquée l'expression de Sox2 et la différenciation des progéniteurs des voies respiratoires adultes (**FIGURE 7**).

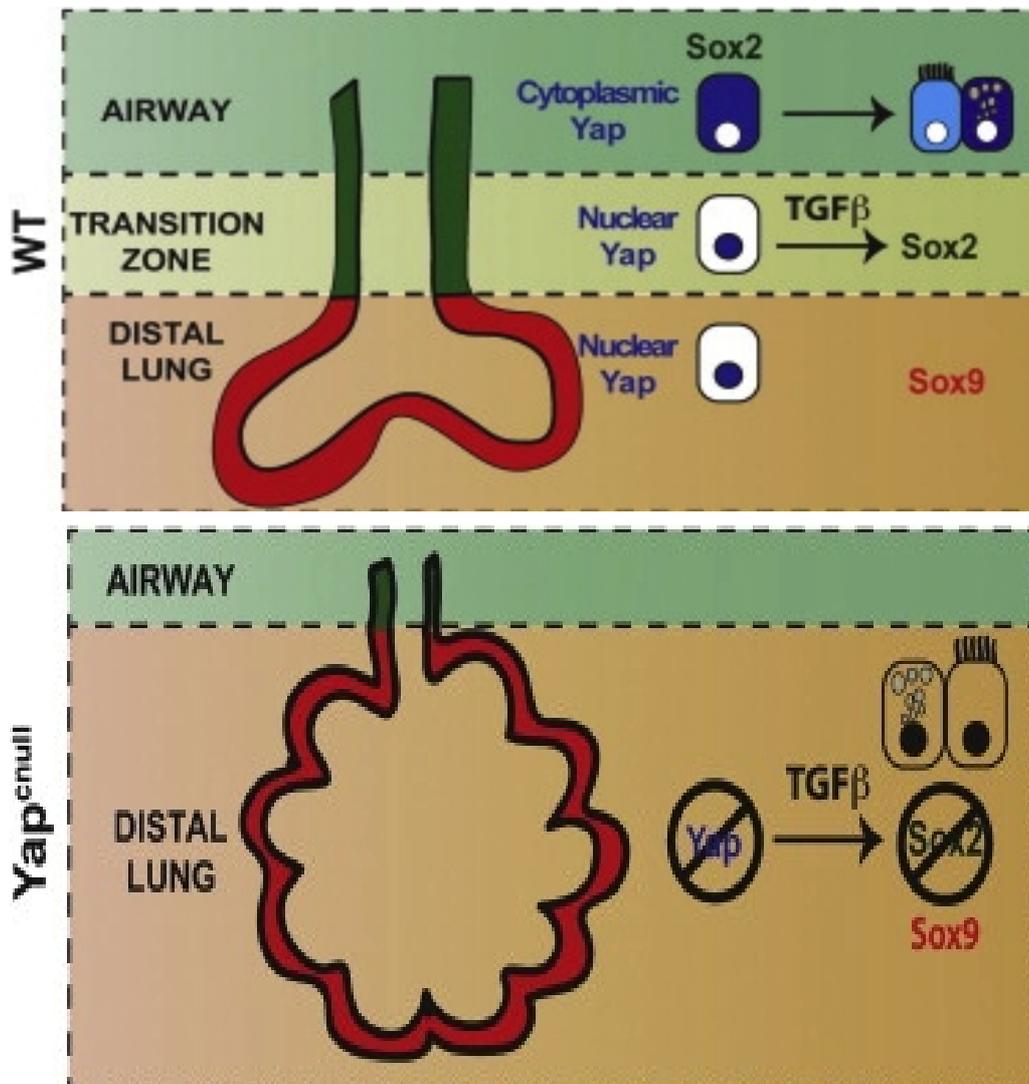


FIGURE 7 - Rôle de YAP au cours du développement pulmonaire initial, d'après Mahoney et al. (78)

L'équipe de *Szymaniak et al.* a pu démontrer que Crumb3, une isoforme de Crumbs qui détermine l'identité du domaine apical épithélial, est nécessaire à la différenciation des voies respiratoires en contrôlant la localisation du régulateur transcriptionnel YAP avec lequel elle peut interagir au pôle apical de la cellule (FIGURE 8) (79). Crumb3 favorise l'interaction entre YAP et les kinases de la voie Hippo LATS/2 aux jonctions cellulaires apicales, pour induire la phosphorylation de YAP et sa rétention cytoplasmique, donnant lieu à une différenciation épithéliale. L'inactivation génétique de Crumb3 dans les voies respiratoires de la souris en développement, ou dans les progéniteurs isolés des voies respiratoires adultes, entraîne une translocation nucléaire une activité incontrôlée de YAP avec un défaut de différenciation cellulaire donnant lieu à un phénotype de cellules indifférencié, possiblement "souche".

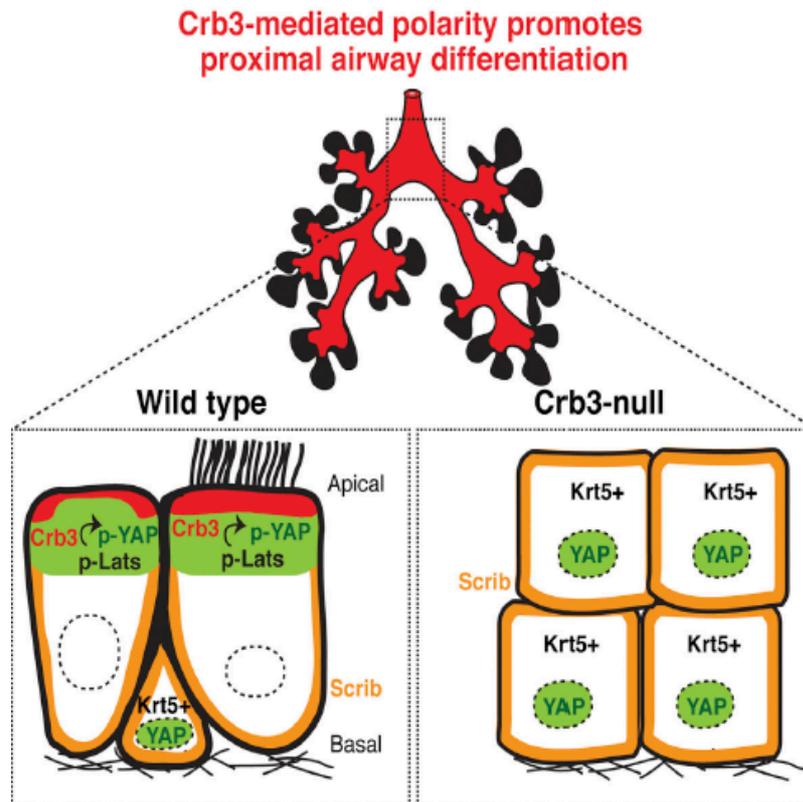


FIGURE 8 - La polarité médiée par Crumbs3 dirige le destin des cellules épithéliales des voies respiratoires par l'intermédiaire de l'effecteur Yap de la voie Hippo, d'après Szymaniak *et al.* (79)

Le knockdown de TAZ dans les cellules épithéliales des poumons de souris entraîne une alvéolisation anormale, mimant ainsi une forme d'emphysème pulmonaire, tandis que le knockdown de YAP entraîne une perturbation de la morphogénèse bronchique au stade embryonnaire (80). Enfin, l'équipe d'*Isago et al.* a démontré que YAP stimulait l'expression de Shh (Sonic hedgehog) et régulerait ainsi la boucle de rétro-contrôle (facteur de croissance des fibroblastes)-SHH, contribuant ainsi à une morphogénèse bronchique normale. De plus, la stimulation du TGF- β (facteur de croissance transformant- β) semble induire l'expression de Shh dans les cellules épithéliales pulmonaires. Ainsi, TAZ et YAP apparaissent-ils tous deux essentiels dans cette voie (**FIGURE 9**) (80).

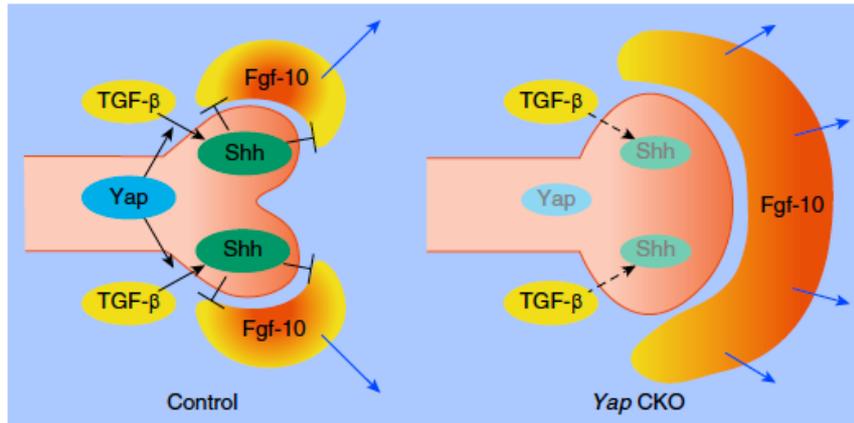


FIGURE 9 - Rôle de l'activité transcriptionnelle de YAP dans le contrôle de la ramification bronchique en interaction avec voie TGFb/Sonic Hedgehog, pour le contrôle de l'action de FGF-10, d'après Isago et al.(80))

Interactome YAP/TAZ

Ne possédant pas de domaine de liaison à l'ADN, les effecteurs terminaux YAP et TAZ doivent se lier à différents facteurs de transcription afin d'activer / moduler la transcription des gènes cibles de ces facteurs de transcription partenaires. Plusieurs études ont permis de cartographier par spectrométrie de masse plus de 300 partenaires interagissant avec YAP et TAZ (81,82) qui ne sont pas tous bien sûr des facteurs de transcription (**FIGURE 10**). Parmi les protéines interagissant avec YAP et TAZ, on peut séparer les facteurs de transcription et les protéines d'adhésion ou cytosquelettiques. Il semblerait que les 4 facteurs de transcription TEAD et les membres de la famille Smad (Smad 1, 2, 3) soient les principaux partenaires transcriptionnels de YAP et de TAZ. Alors qu'il n'existe que *Scaloped* chez la drosophile, il existe en effet 4 facteurs de transcription TEAD chez les mammifères. Le domaine C-terminale des différents TEADs est fortement impliqué dans l'interaction avec YAP et TAZ (83). Ainsi, l'inhibition de l'interaction de YAP/TEAD entraîne une diminution de la transcription des gènes cibles de YAP/TAZ(84). Concernant les protéines n'ayant pas de rôle de facteur de transcription, il existe les protéines modulant sur la transcription (β -caténine et p300) et les protéines contrôlant la localisation cellulaire de YAP/TAZ (AMOT, ZO1, etc) essentiellement impliquées dans l'inhibition de contact et correspondant à des protéines des structures d'adhérence intercellulaire ou au substrat ou des protéines de la spécification de polarité apicale.

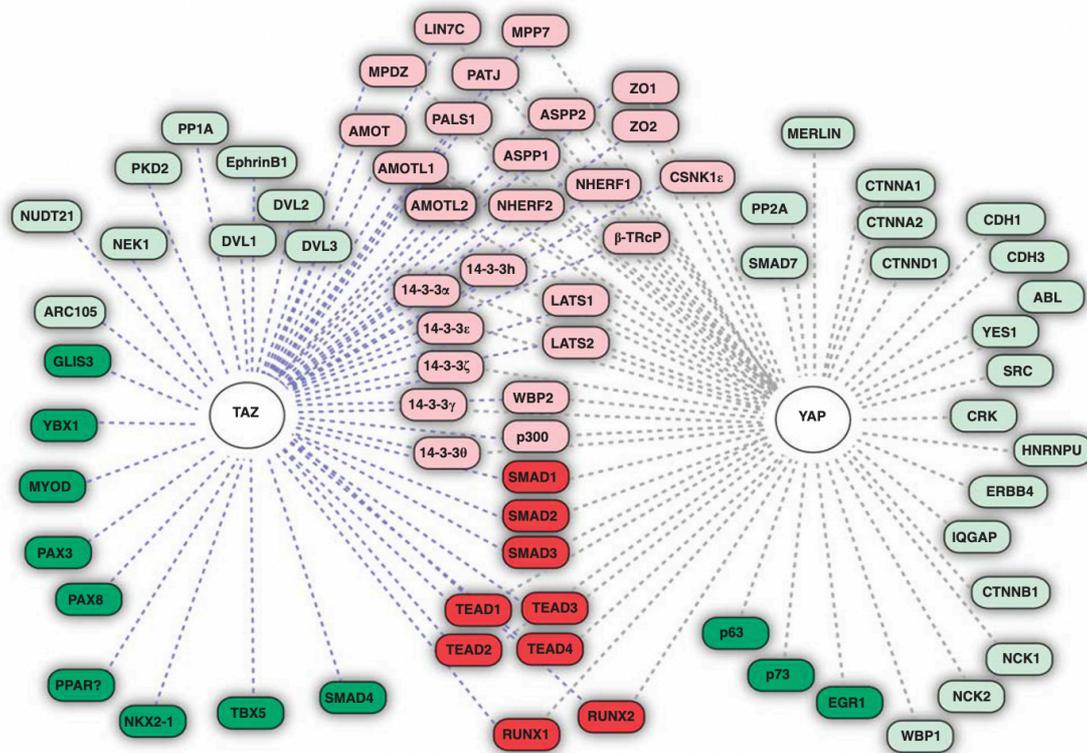


FIGURE 10 - Représentation des partenaires protéiques de YAP et TAZ.

Les facteurs de transcription interagissant de façon indistincte avec YAP ou TAZ sont en rouge foncé, et en vert foncé ceux qui sont plus spécifiques à YAP ou TAZ. Les protéines (autres que facteur de transcription) fixant YAP et TAZ sont en rouge clair, et celles interagissant uniquement avec YAP ou TAZ de façon exclusive sont en vert clair. On voit par cet interactome que YAP et TAZ ne sont pas forcément totalement redondants, avec des interactions spécifiques suggérant des fonctions certes largement superposables mais cependant distinctes.

Gènes cibles

Il est extrêmement difficile de répertorier les différents gènes cibles de YAP et TAZ. Pour les identifier, il ne faut pas se fier exclusivement à la baisse d'expression ARN ou protéique après invalidation par ARN interférent de YAP et/ou TAZ, car ces cibles sont souvent corégulées par plusieurs facteur de transcription, fonction du type cellulaire ou de l'état physiologique de la cellule, l'inactivation des seules YAP/TAZ ne permettant pas

d'observée une diminution d'expression dans ce cas de figure. Ce sont plutôt les données de CHIPseq pangénomiques identifiant les séquences promotrices consensus des TEAD et des séquence actives enhancer parfois très éloignées de l'ATG de ces gènes cibles, qui ont permis de dresser des listes très larges de cibles de YAP/TAZ/TEAD. De fait de nombreux gènes codent pour des protéines impliquées dans la croissance cellulaire, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose. Les gènes CYR61 (Cysteine-Rich angiogenic inducer 61) et CTGF (Connective Tissue Growth Factor) sont les deux cibles les plus souvent décrites et utilisées pour rapporter l'activité transrationnelle de YAP/TAZ (83,84). Ils codent pour deux protéines secrétées, associées à la matrice extracellulaire, très conservées génétiquement, impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la migration, la survie et l'adhésion des cellules épithéliales comme fibroblastiques et sont indispensables au développement embryonnaire(85).

Afin d'identifier les gènes cibles de YAP/TAZ, plusieurs études transcriptomiques ou par *Chip-sequencing* ont été réalisées (86,87). L'analyse par *Chip-sequencing* réalisée sur des lignées cellulaires cancéreuses de sein (MDA-MB 231) a permis de révéler notamment qu'il existait une forte redondance en terme de gènes cibles entre YAP et TAZ (86). De façon intéressante, il a été montré que YAP comme TAZ pouvaient réguler l'expression de gènes codant pour des protéines d'autres voies de signalisation, comme celles de l'EGF, Wnt, et Notch. Réciproquement, la cascade Hippo peut être régulée par des stimuli activant d'autres voies de signalisation : les récepteurs couplés aux protéines G (GPCRs) ayant pour ligands des lipides (Acide LysoPhosphatitique, LPA), lequel active les protéines Rho, des récepteurs hormonaux, ou encore la voie Wnt/ β -caténine.

Les régulateurs en amont

La cascade de phosphorylations des kinases de la voie de signalisation Hippo aboutit à l'inhibition des effecteurs terminaux YAP et TAZ. Des résidus sérine sont ainsi phosphorylés sur YAP/TAZ (5 résidus phosphorylables sur YAP et 3 sur TAZ) par les kinases LATS (LATS1, LATS2, NDR1, NDR2), lesquelles sont elles-mêmes activées par phosphorylation par les kinases d'amont MST1 (Hippo) et MST2 (73) (**FIGURE 6**) . À l'inverse d'autres voies de signalisation « classiques » comme la voie des récepteurs à activité tyrosine kinase, la cascade Hippo n'est pas uniquement régulée par des ligands extracellulaires spécifiques se liant à des récepteurs membranaires. Son activation dépend aussi d'un réseau

constitué de multiples acteurs intervenant dans la polarité cellulaire, la communication intercellulaire et la communication de la cellule avec son environnement (**FIGURE 11**). L'activité de la cascade Hippo est ainsi modulée par des forces mécaniques induites par la rigidité du stroma et de la matrice extra-cellulaire et/ou par des modifications des contacts cellule-cellule (donc par la densité cellulaire). Ces forces mécaniques découlent en fait de la densité cellulaire qui en s'accroissant augmente la "pression" exercée sur les cellules, ce qui déclenche l'activation de la voie Hippo, aboutissant à la phosphorylation inhibitrice de YAP, qui sort alors du noyau, induisant un signal d'arrêt de prolifération (88).

Ainsi, l'architecture épithéliale normale, caractérisée par l'existence d'une polarité apico-basale et le maintien des jonctions cellule-cellule, est un puissant régulateur négatif de l'activité YAP/TAZ, inhibant la prolifération cellulaire et régulant la forme de l'organe et de ses épithélia. Cette polarité est régulée principalement par 3 complexes : Crumbs, Par et Scribble. Le complexe Crumbs composé des protéines Crb1-3, Pals1, PatJ, Lin7c et Mpdz, localisé au niveau des jonctions serrées, il régule la phosphorylation et la localisation des effecteurs YAP et TAZ, *via* son rôle sur la stabilité et la localisation de la protéine Ex (Expanded) (89). Le complexe PAR constitué de Par6, Par3 et aPKC (atypical protein kinase C), régule l'activité de YAP *via* son interaction avec les kinases MST1/2. Quant au complexe Scribble comprenant Scrib, Dlg, et Lgl, localisé au pôle basal des cellules, il a un effet inhibiteur sur le complexe PAR.

Les protéines d'échafaudage des jonctions inter-cellulaires (exemple : protéine NF2, aussi appelée Merlin, codée par le gène suppresseur de tumeur *NF2*), peuvent réguler la cascade Hippo par plusieurs mécanismes, notamment en activant les kinases centrales MST1/2 ou LATS1/2, ou en séquestrant YAP/TAZ phosphorylé en dehors du noyau. De même, la E-cadhérine et son partenaire l'alpha-caténine, constituants principaux des jonctions adhérentes, interagissent avec le complexe protéique formé par YAP et les protéines 14-3-3, et contribuent aussi à la séquestration extra-nucléaire, sous-membranaire, de YAP.

A l'inverse, la perturbation de cette architecture épithéliale normale, avec la mise en route d'un programme de transition épithélio-mésenchymateuse, sous l'effet de mutations oncogéniques par exemple, ou dans le cadre d'un mécanisme physiologique de réparation/cicatrisation tissulaire après agression physique ou chimique, induit l'inhibition de la voie Hippo, et la translocation nucléaire de YAP/TAZ non phosphorylées, donc actives, leur activité de régulation transcriptionnelle, et la stimulation des voies de prolifération cellulaire.

Comme mentionnée plus haut, l'augmentation de la rigidité de la matrice extracellulaire, reproduit les conditions de stress mécaniques d'un tissu au sein duquel les cellules se sont multipliées jusqu'à atteindre une forte densité. Elle peut ainsi réguler la translocation nucléaire du complexe YAP/TAZ : la mise en jeu des interactions entre les complexes d'adhésion à la matrice extracellulaire ou inter-cellulaires, peut modifier le cytosquelette d'actine induisant la cascade de phosphorylations des kinases de la voie Hippo, et donc inhiber YAP/TAZ par phosphorylation d'où leur séquestration hors du noyau ou leur dégradation rapide via le protéasome (90).

Ces stimuli sont impliqués dans la régulation négative de la croissance cellulaire en cas de forte densité cellulaire (inhibition de contact), propriété essentielle des cellules épithéliales normales non cancéreuses, ou en cas de rigidité de la matrice extracellulaire, induite par exemple par une réaction inflammatoire fibroblastique intense entraînant une synthèse accrue de matrice collagène (91).

Le gène *RASSF1A* (*Ras association domain family isoform A*) est un gène suppresseur fréquemment dérégulé dans de nombreux cancers solides (par hyper-méthylation de son promoteur sur un allèle et délétion de l'autre allèle). Il a été suggéré par plusieurs auteurs que RASSF1A formait avec MST1/2 un complexe activant MST1/MST2, d'où la phosphorylation des kinases de la voie Hippo, et l'inactivation des effecteurs terminaux YAP et TAZ par phosphorylation (1,92). Le rôle suppresseur de tumeur de RASSF1A est plus clairement détaillé dans la partie « 3. Voie Hippo/YAP et carcinogénèse ».

Des micro-RNA (miRNA) peuvent aussi réguler en amont la voie Hippo, en régulant l'expression génique de YAP et TAZ. Ces miRNA sont donc plutôt suppresseurs de tumeurs inhibant la prolifération tumorale. Ainsi, en régulant négativement YAP et TAZ, le mir129-5p a été décrit comme suppresseur de tumeur dans le cancer de l'ovaire (93). A l'inverse, les mir135b et mir181c semblent activer YAP/TAZ dans le cancer du sein, en inhibant l'expression de MST1/Hippo, et LATS2 et avoir une activité d'oncomirs, stimulant la prolifération respectivement dans le cancer du sein et celui du pancréas (94–96).

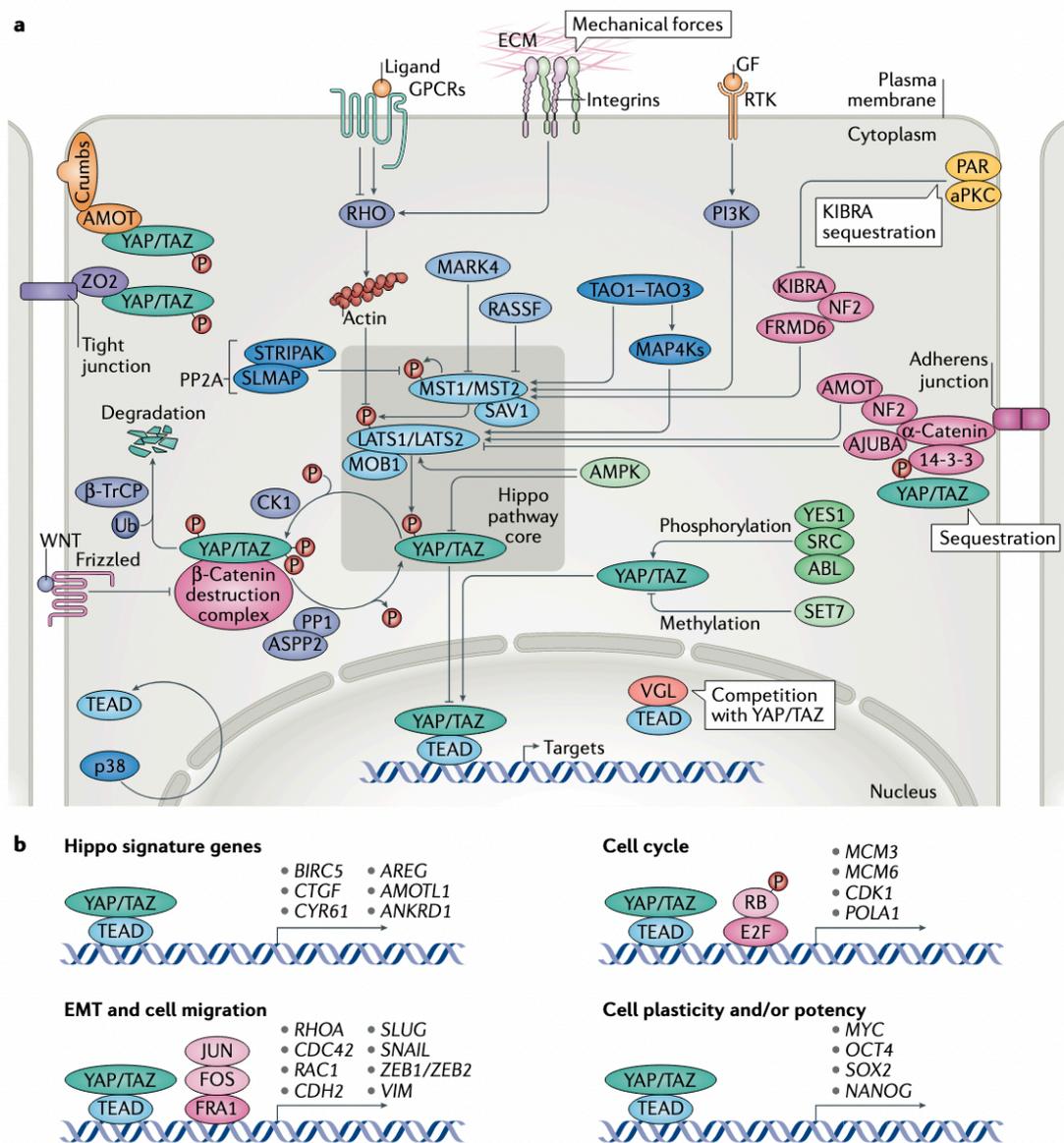


FIGURE 11 - Représentation schématique de la régulation de la voie de signalisation Hippo/YAP, d'après Moya et al. 2019 (97)

a/ La voie de signalisation Hippo est régulée par plusieurs mécanismes en amont qui impliquent principalement :

-les **jonctions cellulaires** par l'intermédiaire de diverses protéines d'échafaudage telles que l'angiomotine (AMOT), la neurofibromine 2 (NF2 ; également appelée Merlin), protéine du rein et du cerveau (KIBRA ; également connue sous le nom de WWC1), AJUBA et zonula occludens (ZO) ;

-la **polarité cellulaire**, y compris le complexe Crumbs et le complexe aPKC-PAR,

-les **forces mécaniques** par le biais du cytosquelette d'actine et la signalisation par les intégrines de la matrice extracellulaire (MEC)

b/ Gènes cibles de YAP/TAZ

3. Voie Hippo/YAP et carcinogénèse

L'implication de la voie de signalisation Hippo/YAP dans la carcinogénèse a été explorée dans de nombreuses études, avec notamment son rôle dans la croissance tumorale, la cascade métastatique ou encore dans la résistance aux traitements. Les membres de cette voie semblent être très souvent dérégulés dans de nombreux cancers. Les effecteurs YAP et TAZ sont plutôt considérés comme des oncogènes parfois amplifiés au plan génique, tandis que les kinases de la cascade Hippo ont des propriétés suppressives de tumeur, leur gènes étant souvent inactivés par méthylation de leur promoteur, délétion ou mutations ponctuelles inactivatrices (98).

YAP/TAZ et cancer pulmonaire

La **FIGURE 8** résume les différentes tumeurs pour lesquelles des données épidémiologiques et des preuves fonctionnelles de l'activation de YAP/TAZ ont été rapportées.

L'analyse de l'expression de YAP au niveau nucléaire et cytoplasmique par immunohistochimie (IHC) a permis de retrouver une augmentation de l'expression de YAP dans différents types de tumeurs, et notamment dans les adénocarcinome pulmonaire, colique, de l'ovaire et du sein (62). L'expression protéique de TAZ semble aussi être augmentée dans certains cancers (99,100). La surexpression protéique de YAP et TAZ est associée à une survie globale plus faible chez ces patients dans la plupart des séries (99,100).

Dans le cancer pulmonaire, l'analyse IHC a montré qu'une expression/localisation nucléaire élevée de YAP ou de TAZ était corrélée avec des caractéristiques de mauvais pronostic (grade histologique élevé, stade TNM tardif, métastases ganglionnaire) (101–106). Ainsi, l'équipe de *Wang et al.* a étudié l'expression de YAP sur 92 échantillons de cancers pulmonaires en immunohistochimie et a constaté que YAP était exprimé dans 66,3% des patients, et avec une localisation principalement nucléaire. L'expression de YAP dans le CBNPC était significativement corrélée au stade pTNM ($p=0,0037$) et aux métastases ganglionnaires ($P = 0,0093$). Par ailleurs, l'expression de YAP était associée à une survie globale plus courte (101).

L'équipe de *Xie et al.* a analysé l'expression en IHC de TAZ chez 181 patients atteints d'un CBNPC. De même que YAP, TAZ était exprimé dans 66,8% des cellules tumorales et

s'accompagnait d'une survie globale plus faible (47,1% contre 61,8 mois dans le groupe n'exprimant pas TAZ) (105).

Dans des modèles murins de CBNPC, les tumeurs non métastatiques induites par le *knock-in* de l'oncogène KrasG12D dans les cellules alvéolaires présentent un très faible marquage de YAP/TAZ, alors que des niveaux élevés de YAP/TAZ nucléaires peuvent être observés dans les tumeurs métastatiques induites par activation oncogénique de K-RAS avec la perte bi allélique de Tp53 ou de STK11/Lkb1 (107).

Afin d'étudier le rôle de YAP/TAZ, ces analyses d'immunohistochimie ont été complétées par des études fonctionnelles. Notamment, certaines équipes ont étudié l'effet du *knock-down* de YAP/TAZ dans la lignée cellulaire A549 dont on rappelle qu'elle présente une mutation oncogénique de H-RAs, une mutation de STK11 et une méthylation de RASSF1A avec délétion de l'autre allèle par perte du bras court de chromosome 3p. De façon très intéressante, l'inactivation de YAP/TAZ entrave alors la greffe tumorale des A549 chez ces souris (102,104). Cependant, l'activation de YAP/TAZ semble ne pas être suffisante pour favoriser la formation d'un CBNPC. En effet, l'activation de YAP dans l'épithélium des souris provoquait une hyperplasie sans pour autant déclencher la formation de tumeurs (108), alors que la récapitulation d'un cancer bronchique invasif chez la souris nécessiterait la coopération de plusieurs altérations génétiques altérant les gènes CDK4, hTERT, TP53, K-Ras et c-Myc (109).

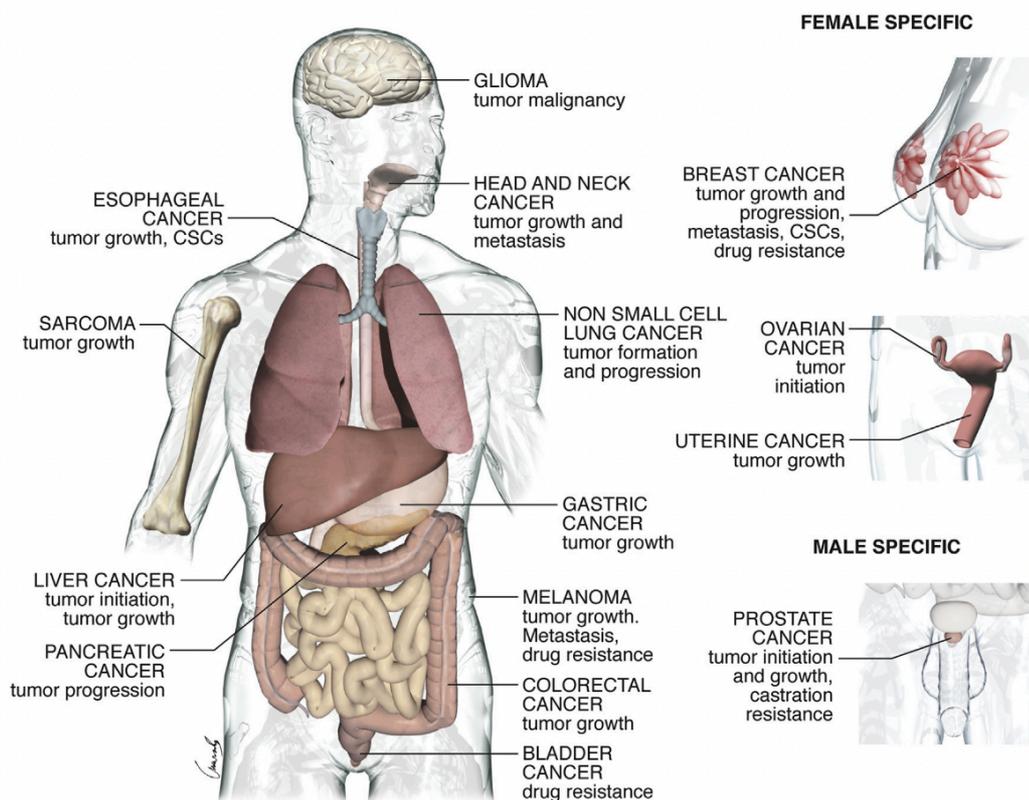


FIGURE 12 - Activation de YAP/TAZ et cancers

D'après Zanconato et al. Cancer cell. 2016 (98)

Plus récemment, des études de séquençage ARN de nouvelle génération de cancers bronchiques à petites cellules (CBPC), émanant de plusieurs équipes différentes ont mis à jour un rôle jusqu'alors insoupçonné de la signalisation passant par YAP. Le groupe de Charles Rudin, a défini l'existence de 4 sous-groupes de CBPC au plan transcriptomique (110,111), définis par leur signature transcriptomique spécifique, dont un groupe dit "YAP1". Si les trois autres groupes dénommés ASCL1, NEUROD1 et POU2F3 selon la signature transcriptomique induite par chacun de ces facteurs de transcription ont été décrits par d'autres groupes (112,113), le sous-type YAP1 n'est individualisé que par l'équipe de *Gay et al.*, sous le vocable de "inflamed", associé à la réponse à l'immunothérapie. A l'inverse les quelques lignées de CBPC dites "YAP1" sont caractérisées par une diminution de leur chimiosensibilité aux cytotoxiques par comparaison aux autres lignées (111). Des analyses de séquençage transcriptomique en cellule isolées, suivies d'analyses informatiques sophistiquées de trajectoires selon le profil d'expression transcriptomique dans une échelle pseudo-temporelle, semblent montrer que le sous-groupe ASCL1, dérivant d'une cellule souche neuro-endocrine,

est fondateur de la lignée (au sens "lineage") micro-cellulaire, dérivant par la suite vers le sous-type NEURO-D1, les deux ayant une différenciation neuro-endocrine affirmée, puis vers le sous-type YAP1 après acquisition d'une activation MYC (c-Myc étant une cible transcriptionnel de YAP/TEAD), aussi caractérisé par un phénotype moins neuroendocrine et l'activation concomitante de la voie Notch sous l'effet de MYC (114). Ces trajectoires évolutives témoignent de la plasticité évolutive des carcinomes bronchiques à petites cellules, qui implique la voie YAP (**FIGURE 13**).

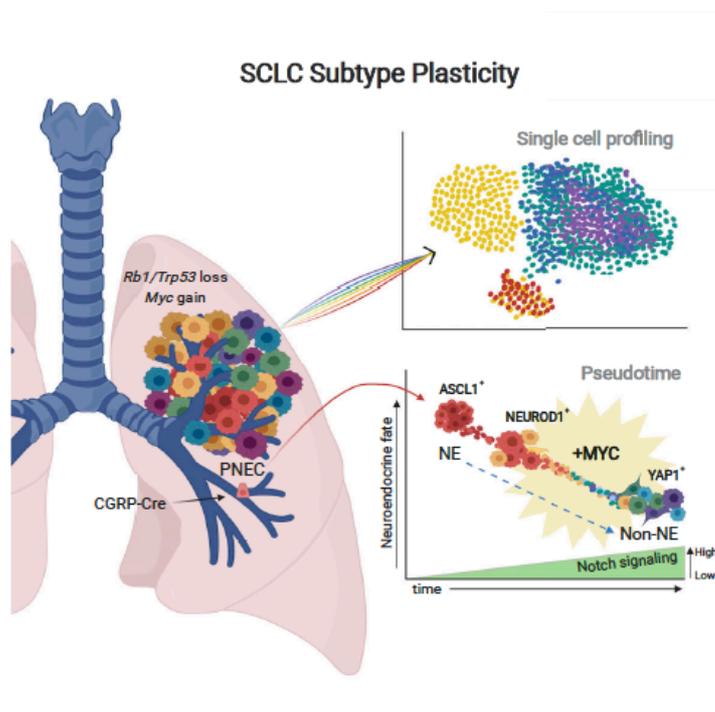


FIGURE 13 - Plasticité des carcinomes bronchiques à petites cellules jusqu'au sous-type YAP1. D'après Ireland AB et al. (114)

Propriétés du cancer régulées par YAP/TAZ

La représentation des conséquences cellulaires de l'activation de YAP/TAZ est résumée sur la **FIGURE 14** (98). L'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ entraîne l'acquisition de propriétés de prolifération, d'invasion, de migration dans les cellules tumorales. Quelques références mentionnant le rôle de YAP/TAZ dans la transformation sont listées dans le **TABLEAU 2**.

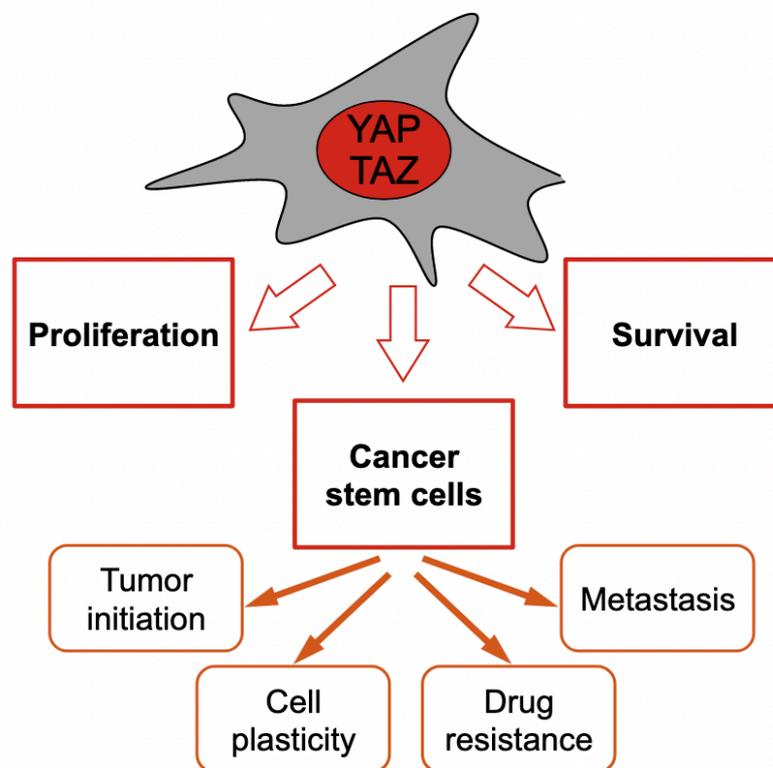


FIGURE 14 - Représentation schématique des fonctions de YAP/TAZ dans la carcinogénèse.

D'après Zanconato *et al.* *Cancer Cell.* 2016 (98)

L'activation soutenue de YAP/TAZ favorise une prolifération cellulaire aberrante. Les mécanismes intimes de cette action proliférative n'ont été explorés que récemment dans les cellules cancéreuses, mettant en évidence un vaste programme transcriptionnel lié à la progression du cycle cellulaire en aval de l'activation de YAP/TAZ (73,98,115–117). En effet, certains gènes impliqués dans la réplication de la synthèse et de la réparation de l'ADN, le contrôle des cyclines pour l'entrée en phase S et l'achèvement de la mitose (exemples : CDC25A, CDCA5, KIF23...) ont été identifiés comme étant des gènes cibles de YAP/TAZ/TEAD. Dans l'étude de *Zanconato et al.*, la déplétion en YAP/TAZ était ainsi associée à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (86).

Les cellules cancéreuses présentent généralement une résistance accrue à la mort cellulaire programmée dont l'apoptose est la voie la plus connue. L'augmentation de YAP/TAZ peut être corrélée à un échappement à l'apoptose, notamment induite par le détachement des cellules c'est-à-dire l'anoïkis (par exemple pour migrer en dehors de leur épithélium d'origine). Cette activation de YAP est induite par le détachement et la réorganisation du cytosquelette qui en découle (118). L'activation de YAP augmente de fait la transcription de Bcl2, codant pour une protéine anti-apoptotique (119) et peut réprimer la transcription de protéines Bcl pro-apoptotiques telle que BIM (120).

De manière intrigante, YAP/TAZ jouent un rôle primordial dans la reprogrammation de cellules cancéreuses non souches en cellules souches cancéreuses (CSC) (121,122). Ainsi *Cordenonsi et al.* ont confirmé que l'inactivation de TAZ par ARN interférent (SiRNA), dans des cellules de lignées de cancer du sein agressif, était associée à une formation plus faible de mammosphères, suggérant le rôle nécessaire de TAZ pour maintenir les capacités d'auto-renouvellement et d'initiation tumorale des CSC du sein.

YAP/TAZ orchestrent donc une multitude de fonctions dans la carcinogénèse. Dans les cellules épithéliales, YAP/TAZ favorisent aussi la synthèse et la sécrétion d'AREG (un facteur de croissance EGF-like) (3), de protéines matricielles telles que Cyr61 et CTGF (également connues pour favoriser la vasculogénèse), et d'un chimio-attractant (CXCL5) pour les cellules myéloïdes suppressives des cellules T favorisant l'installation de la tolérance immunitaire (33,72).

YAP semble impliqué dans la production d'interleukines inflammatoires et apparaît nécessaire pour que les CAF élaborent une matrice plus rigide, favorisant ainsi l'invasion des cellules cancéreuses et l'angiogénèse (123,124). Le remodelage de la matrice et la promotion de l'invasion des cellules cancéreuses nécessitent le cytosquelette d'actomyosine. YAP régule l'expression de plusieurs régulateurs du cytosquelette, notamment ANLN (anilline, protéine

interagissant avec l'actine F, couplant l'actine-myosine au cytosquelette de tubuline via RAC1, et interagissant avec DIAPH2) et DIAPH3 (protéine de capping de l'actine de la famille des formines, effecteur des Rho), et contrôle aussi l'expression de MYL9 (également connu sous le nom de MLC2, la chaîne légère de myosine 9). La rigidification de la matrice renforce encore l'activation de YAP, établissant ainsi une boucle d'auto-renforcement qui contribue au maintien du phénotype CAF (124,125). Ainsi, YAP/TAZ influencent la composition chimique, physique et cellulaire du microenvironnement tumoral.

Hippo Pathway Component/Regulator	Increase/Decrease/Prognosis	Reference	N
YAP	Protein level increases in 70% NSCLC tissues. Bad prognosis. Correlation with late T stage, TNM stage and lymph node metastasis.	Su, L.L., et al.,2012 [72]	40
	Protein level increased in 66.3% NSCLC tissues and predominantly nuclear. Bad prognosis. Correlation with TNM stage, lymph node metastasis, shorter O.S.	Wang, Y., et al.,2010 [73]	92
	YAP gene amplified in NSCLC cell lines and in 23% NSCLC tissues.	Lorenzetto E., et al, 2014 [74]	77
	Protein Level and Nuclear localization Increased in LAC. Bad prognosis. correlation with TNM stage, cyclinA overexpression, increased EGFR copy number.	Kim, J.M., et al., 2011 [75]	168
	Increased Nuclear localization. Increased nuclear and reduced cytoplasmic expression in NSCLC cell lines and tissues.	Guo, J., et al., 2017 [76]	4
	Protein level increased in 87.8% LAC. Bad prognosis.	Cui, Z.L., et al., 2012 [77]	49
	YAP1 R331W Missense germline mutation in 1.1% patients with LAC with respect to 0.18% in healthy control. Predictive of LAC predisposition. Bad prognosis. Shorter survival when overexpressed with TAZ, SCD1 and β -catenin.	Chen, H.Y, et al.,2015 [81] Noto, A., et al., 2017 [64]	1312 LAC 1135 healthy controls 10
TAZ	Bad prognosis. Shorter survival when overexpressed with YAP, SCD1 and β -catenin.	Noto, A., et al., 2017 [64]	10
	Overexpressed in NSCLC cells.	Zhou, Z., et al., 2011 [78]	cells
	Overexpressed in 66.8% NSCLC. Bad prognosis. Correlated with TNM stage and lymph node metastasis, invasion, shorter O.S and D.F.S.	Xie, M., et al., 2012 [79]	181
LATS2	Bad prognosis. Shorter survival. High TAZ expression at the genomic, mRNA, and protein levels in Squamous cell Carcinoma patients with respect to controls.	Noguchi, S., et al., 2014 [80]	345 NSCLC patients 18 healthy controls
	Transcript Downregulated in NSCLC.	Strazisar, M., et al., 2009 [103]	129
	Promoter hypermethylated in 71% NSCLC.	Malik, S.A., et al., 2017 [105]	79
LATS1	Lower protein and transcript expression in LAC. Good prognosis. Increased O.S and D.F.S.	Luo, S., et al., 2014 [108]	79
	Promoter hypermethylated in 66.66% NSCLC.	Malik, S.A., et al., 2017 [105]	79
AMOT	Good prognosis. correlated with TNM stage, lymph node metastasis.	Lin, X.Y., et al., 2014 [109]	136
	Downregulated in 45.8% NSCLC patients	Hsu, Y.L., et al., 2014 [111]	24
ABL1, ABL2	ABL1 and 2 are somatically mutated in 1.5% and 4% NSCLC patients, ABL2 is amplified in 8% NSCLC.	Testoni, E., et al., 2016 [88]	N.A
LKB1	Gene mutated in 18% LAC patients.	Ding, L., et al., 2008 [124]	188
	Gene inactivated in 54% of LAC cell lines.	Carretero, J., et al., 2004 [125]	11
	Gene inactivated in 33% NSCLC patients.	Sanchez-Cespedes, M., et al., 2002 [127]	20
	Gene mutated in 8% NSCLC patients (7/91) and in 39% (20/51) NSCLC cell lines. Good prognosis.	Matsumoto, S., et al., 2007 [128]	91 patients 51 cell lines

	Promoter hypermethylated in 40% of primary lung tumors, missense mutation in 10% of primary lung tumors.	Dammann, R., et al., 2000 [117]	60
RASSF1A	Promoter hypermethylated in 72% of SCLC, 34% of NSCLC.	Agathangelou, A., et al., 2001 [118]	29 SCLC, 41 NSCLC (hypermet study)
	Loss of heterozygosity (LOH) in 86% SCLC (31/36), 91% (10/11) Squamous cell carcinoma, 71% (15/21) LAC.		36 SCLC, 48 NSCLC (LOH study)
	Transcript Not expressed in 100% SCLC, 64% NSCLC. Promoter hypermethylated in 100% SCLC. Good prognosis. Hypermethylation was associated with impaired patient survival.	Burbee, D.G., et al., 2001 [119]	47 SCLC, 107 NSCLC
	Promoter hypermethylated in 21.8% NSCLC patients. Good prognosis in patients expressing higher levels of RASSF1A.	de Fraipont, F., et al., 2012 [120]	202
VGLL4	Transcript downregulated in LAC tumor respect to non tumoral tissues (29/30)	Zhang, W., et al., 2014 [113]	30
	Lower levels of nuclear protein in LAC compared to normal lungs: 92.6% of patients (25/27) exhibited high nuclear VGLL4 expression in their normal lungs, whereas only 22.1% of patients (17 out of 77) had high nuclear expression of VGLL4 in their lung ADCs		
Ski	Promoter hypermethylated in 56% of NSCLC tumor samples and in NSCLC cell lines Good prognosis.	Xie, M., et al., 2017 [130]	168

Red indicates proteins that activate YAP or TAZ oncogenic function, are upregulated or hyperactivated in NSCLC, and whose upregulation is associated with poorer prognosis in NSCLC. Blue indicates proteins that inhibit YAP and TAZ oncogenic function, are downregulated in NSCLC and whose upregulation is associated with better prognosis. When control patients are not indicated, number of patients indicates only those who bear NSCLC. When the number of control patients is indicated, the study compares NSCLC patients with healthy controls. LAC = lung adenocarcinoma; TNM = tumor node metastasis stage; D.F.S. = disease-free survival; O.S. = overall survival; N = number of patients or cell lines.

TABLEAU 2 – Résumé des membres de la voie Hippo et régulateurs en amont dérégulés dans le CBNPC, D’après Lo Sardo et al. *Cancers* 2018 (126)

Mécanismes d'activation de la voie Hippo et régulateurs amont dans la cancérogénèse

Même s'il a été établi dans de nombreuses études que la voie Hippo est une voie suppressive de tumeur, peu de mutations ont été réellement décrites (58,98,127,128). Ainsi, on peut penser que l'activation de YAP/TAZ dans la cancérogénèse passe par d'autres mécanismes (98). La liste des membres de la voie Hippo ainsi que les régulateurs en amont dérégulés dans le CBNPC sont résumés dans le Tableau 2 (126)

Chez l'homme, les mutations stop du gène *NF2*, retrouvée dans le mésothéliome, le schwannome, et le méningiome, semblent représenter les rares mutations décrites de la voie de signalisation Hippo (129–131). Un certain nombre d'altérations génétiques récurrentes ont été répertoriées dans le mésothéliome pleural (MP). La mutation du gène suppresseur de tumeur *NF2* a été la première altération génomique retrouvée dans le MP (50%) (132). Le gène *NF2*, situé sur le bras court du chromosome 22(22q), code pour la protéine merlin, membre de la famille ERM (ezrine, radixine, moesine), essentielle à la polarité apico-basale des cellules épithéliales. La perte d'expression de ce gène participe donc à la dédifférenciation et la perte d'adhésion, favorisant la prolifération, la migration cellulaire et l'invasion tumorale.

L'autre événement clé de l'histoire naturelle des cancers pulmonaires et des MP est l'inactivation précoce du gène suppresseur de tumeur *RASSF1A* (*Ras association domain family 1*) dans 30 % des cancers pulmonaires non à petites cellules (CPNPC) (et 35% des MPM), par hyperméthylation de son promoteur et perte de l'autre allèle par délétion de tout ou partie du bras court du chromosome 3 (1,133). *RASSF1A* appartient à une superfamille de protéine possédant de fortes homologies entre elles, constituée de 10 membres (*RASSF1* à *10*), dont le premier représentant a été caractérisé comme un effecteur de RAS activé, cette famille possédant un domaine d'interaction (RA) avec les protéines de la superfamille RAS (134). *RASSF1* code pour 2 transcrits majoritaires par épissage alternatif et à partir de 2 promoteurs distincts, *RASSF1A* et *RASSF1C*, dont seul le promoteur 1A peut être hyperméthylé (68). Cette méthylation aboutit à la perte d'expression de *RASSF1A*, et l'expression de *RASSF1C* dont le promoteur est peu utilisé dans la cellule épithéliale normale (135,136). De fait *RASSF1A* est un gène suppresseur de tumeur, indispensable à l'homéostasie cellulaire inactivé à une étape précoce de la carcinogenèse (particulièrement dans le cancer bronchique) rendant compte de plusieurs désordres dans différents processus cellulaires tumoraux, liés à la mise en jeu de *RASSF1C*, considéré comme oncogénique (68). En collaboration avec L'intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT), notre équipe avait ainsi montré le rôle majeur dans la transformation épithéliale maligne bronchique de la méthylation

du promoteur du gène RASSF1A et son impact pronostique dans le cancer bronchique non à petites cellules(137). En effet, grâce à sa liaison directe ou indirecte avec les microtubules, RASSF1A régule l'activité mitotique et la migration cellulaire. D'autres interactions, comme par exemple avec sa cousine NORE1A/RASSF5, lui permettent de contrôler les processus apoptotiques. L'inactivation de *RASSF1A* est associée à un mauvais pronostic et favorise la propagation métastatique. L'équipe de recherche Caennaise où j'ai eu l'honneur de réaliser mon Master 2, a ensuite réussi à prouver que l'inactivation de RASSF1 par *SiRNA*, conférait un phénotype invasif aux cellules cancéreuses en induisant une transition épithélio-mésenchymateuse(1). *Dubois et al.* ont décrit le rôle suppresseur de RASSF1A dans les cellules de CBNPC sur la migration et l'invasion cellulaire *via* la double régulation du cytosquelette par la protéine RhoB et son facteur d'échange GEF-H1 ayant pour conséquence l'activation de YAP. Ainsi, l'équipe du Pr. Zalzman et du Dr. Levallet a montré que l'acquisition par les cellules bronchiques de propriétés de migration et d'invasion, comme d'anomalie de cytokinèse après invalidation du gène RASSF1A et activation de YAP, était liée à la dysrégulation du cytosquelette par inactivation de la GTPase RhoB, conséquence de l'inactivation de son facteur d'échange GEF-H1, par phosphorylation par la YAP-kinase NDR2, décrivant ainsi une nouvelle boucle de signalisation mise en jeu dans la carcinogenèse bronchique (138).

Il a été récemment démontré que la kinase LKB1/STK11 inactive YAP/TAZ par le biais de l'activation de MST1 ou par des voies indépendantes de la voie Hippo en réponse à un stress métabolique (107,139). L'inactivation de LKB1 est impliquée dans la carcinogenèse bronchique puisqu'il s'agit du troisième gène le plus fréquemment muté dans les adénocarcinomes (140). Dans les modèles de cancer du poumon chez la souris, la régulation à la baisse de LKB1 ne conduit pas la tumorigenèse par elle-même, mais elle induit un phénotype plus agressif des cellules ayant déjà une mutation activatrice de K-RAS(141).

Malik et al. ont déterminé chez 69 patients atteints d'un CBNPC la fréquence de l'hyper-méthylation des promoteurs LATS1 et LATS2. Elles étaient respectivement à 66,66 % (46/69) et 71 % (49/69) dans les tissus de CBNPC (142). L'inactivation de LATS1 est par ailleurs associée à une survie globale plus faible chez ces patients.

En 2015, j'ai réalisé un Master 2 dirigé par le Pr. Gérard Zalzman et Dr Guénaëlle Levallet et au sein du laboratoire Œstrogène Reproduction Cancer UPRES 2608 de l'Université de Caen-Basse Normandie. Ce travail mené aux côtés d'une doctorante Elodie Maille a permis d'aboutir à un article paru dans le BJC intitulé « MST1/Hippo promoter gene methylation predicts poor survival in patients with malignant pleural mesothelioma in the IFCT-GFPC-

0701 MAPS Phase 3 trial »(3). Cet article est présenté en Annexe de ce manuscrit (**ANNEXE 1**). Nos recherches, ont permis d'établir une corrélation entre la méthylation du promoteur du gène de la kinase MST1 et la réduction de la survie globale chez les patients atteints de MPM. En transfectant les cellules avec un siRNA-MST1, pour mimer cette méthylation et inactivation de MST dans des cellules mésothéliomateuses, nous avons ensuite rapporté que l'inactivation de MST1 augmentait la prolifération, l'invasion et la formation de colonies cellulaires en agar de cellules de lignées cellulaires MPM tout en diminuant leur activité apoptotique basale. Enfin, nous avons confirmé que l'effet de la perte d'expression de MST1 dépendait de l'activation inappropriée de YAP (3).

4. Voie Hippo/YAP et résistance au traitement

Malgré les améliorations spectaculaires dans la prise en charge du CBNPC au cours des dernières décennies, une réponse complète et durable obtenue par traitement systémique constitue encore un événement rare du fait de résistances primaires ou de l'émergence de résistances acquises. Il est donc essentiel d'identifier la nature de ces mécanismes de résistance afin de concevoir des stratégies de traitement optimales pour les combattre et prévenir une éventuelle progression tumorale. La résistance aux médicaments est un défi majeur dans les traitements systémiques du cancer. Plusieurs études suggèrent l'implication de la voie Hippo/YAP dans les mécanismes de résistance aux traitements anti-cancéreux, notamment aux agents cytotoxiques, aux thérapies ciblées, et à l'immunothérapie(143). De plus, l'expression de PD-L1 et de plusieurs cytokines sous le contrôle transcriptionnel de YAP/TAZ est essentielle à l'évasion immunitaire des tumeurs. Bien que les mécanismes varient en fonction des cytotoxiques ou traitements ciblés utilisés, ils convergent souvent vers une transcription accrue des gènes cibles de YAP/TAZ, soit par l'inactivation des membres de la voie Hippo, soit par l'activation directe de YAP et/ou TAZ.

YAP/TAZ et réponse aux thérapies ciblées

De nombreuses thérapies ciblées, en agissant sur des cibles cruciales pour la survie et la croissance tumorale, sont utilisées dans le CBNPC. L'efficacité des thérapies ciblées contre le cancer a été démontrée pour la toute première fois avec l'inhibition de Bcr-Abl, grâce à l'imatinib dans la leucémie myélogène chronique (LMC) et la leucémie lymphocytaire aiguë (LAL) entraînant une réponse objective et durable chez plus de 50 % des patients (144). Depuis, d'autres cibles ont été découvertes qui se sont avérées être très intéressantes, notamment l'EGFR dans le CBNPC, le VEGFR dans le cancer du rein à cellules claires, la mutation B-RAFV600E dans le mélanome. Cependant, inéluctablement les tumeurs des patients sous thérapie ciblée développent une résistance secondaire à ces thérapies ciblées, les résistances primaires étant plus rares bien que possibles. La dérégulation de la voie de signalisation Hippo/YAP pourrait constituer un mécanisme de résistance majeur aux thérapies ciblées, et en particulier aux inhibiteurs de l'EGFR, de B-RAF ou de MAPK. L'inactivation de la voie Hippo entraîne l'entrée de YAP/TAZ dans le noyau et donc l'expression de certains gènes anti-apoptotique tels que Bcl-xl et survivin contribuent à cette résistance.

La moitié des mélanomes ont une mutation activatrice B-RAFV600E qui entraîne une activation constitutive de la voie de signalisation des MAPK (MEK-ERK)(145). La combinaison thérapeutique d'un inhibiteur de MEK et d'un inhibiteur de B-RAF permet d'enrayer rapidement la prolifération tumorale et entraîne un allongement de la survie à long terme chez les patients atteints d'un mélanome métastatique avec mutation B-RAF V600E. Malheureusement, une résistance secondaire est un événement inévitable (146). YAP et TAZ ont été identifiés comme des acteurs importants de cette résistance secondaire aux inhibiteurs de B-RAF et MEK. En effet, ces traitements anti-B-RAF induisent un remodelage du cytosquelette d'actine et favorise l'activation de YAP via l'inhibition de LATS1/2 médiée par Rho dans les cellules de mélanome B-RAF mutées (147). L'équipe de Trevor Bivona s'est intéressée aux mécanismes d'échappement aux inhibiteurs de B-RAF (vémurafenib) ou de MEK (tramétinib) dans différentes tumeurs (2). Les auteurs ont identifié le rôle prépondérant de YAP dans la résistance des cellules tumorales aux inhibiteurs de la voie MAP kinase. Ils ont pu montrer par une stratégie d'inactivation par ARN interférence de YAP, dans des cellules avec mutation activatrice de K-Ras ou B-Raf un phénomène de létalité synthétique lorsque B-RAF ou MEK étaient ciblées par un inhibiteur pharmacologique simultanément avec l'inactivation de YAP. Cette approche pourrait constituer une stratégie prometteuse pour

améliorer la durée de réponse au traitement et la survie des patients , en retardant l'émergence de clones résistants (2). Le principe de létalité synthétique dans ce modèle d'activation de la voie MAP Kinase est schématisé sur la **FIGURE 15**.

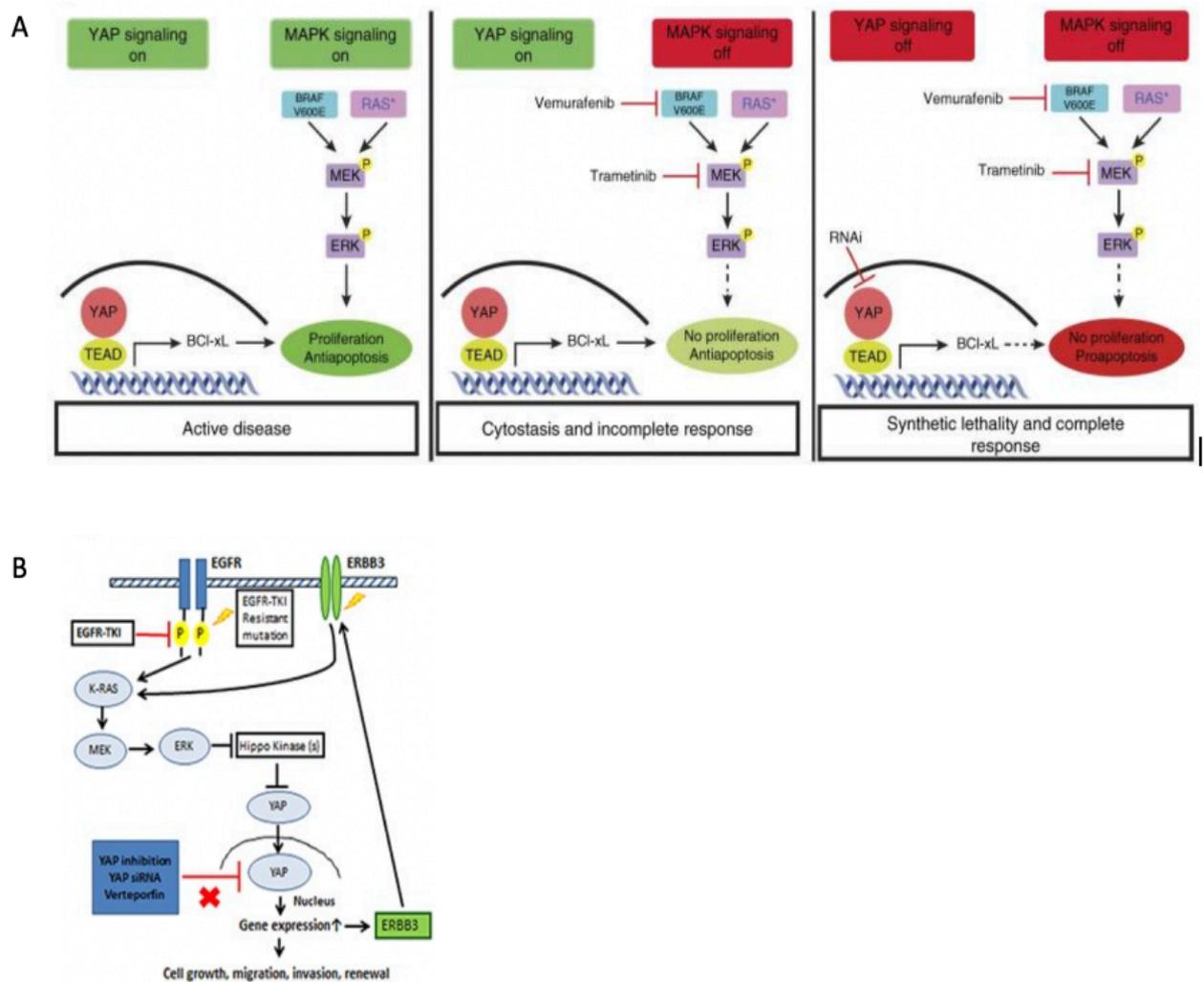


FIGURE 15 - La combinaison ITK et inhibiteur de YAP pourrait être une stratégie prometteuse

- A. Principe de létalité synthétique. Association des inhibiteurs de BRAF, de MEK et de YAP chez les mélanome mutés B-RAF V600E, d'après *Lin et al. Nat genet 2015* (2)
- B. Association d'un ITK avec un inhibiteur de YAP dans les CBNPC EGFR mutés, d'après *Hsu et al. Oncotarget, 2016* (148)

Les petites GTPases de la famille RAS, K-RAS, H-RAS et N-RAS, activent directement la voie des MAPK. Des inhibiteurs de cette famille commencent à émerger dans certains cancers comme le CBNPC avec mutation K-RAS G12C. Plusieurs études ont établi que YAP était un facteur clé pour échapper à la dépendance de K-RAS/MAPK. La résistance acquise à la suppression de K-RAS dans des modèles murins de cancer du poumon et de cancer pancréatique induit par mutation activatrice de K-RAS impliquerait également une augmentation de la signalisation de *YAP1* (116,149). K-RAS et YAP1 convergent vers le facteur de transcription FOS et le complexe transcriptionnel AP-1 (Fos/Jun), activant ainsi un programme transcriptionnel impliqué dans la régulation de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Pris ensemble, ces résultats impliquent la régulation transcriptionnelle de l'EMT par YAP1 comme une composante importante de la signalisation oncogène de RAS et de l'échappement aux inhibiteurs RAS/MAPK (149). Enfin, utilisant un modèle de souris génétiquement modifiées pour développer un cancer pulmonaire avec mutation K-Ras, une étude récente a montré que l'invalidation de YAP était suffisante pour surmonter la résistance des cellules cancéreuses pulmonaire mutantes K-RAS, à un traitement combiné par sélumétinib (inhibiteur de MEK) et momelotinib (inhibiteur de TBK1/JAK) (150).

En amont de la signalisation RAS-MAPK, les inhibiteurs du récepteur tyrosine kinase (ITK) à l'EGF, ont clairement montré leur efficacité chez les patients avec un CBNPC porteur de mutation oncogénique additive de l'EGFR(49). Malheureusement, comme pour toutes les thérapies ciblées, une résistance aux ITK se développe inéluctablement chez tous les patients après quelques mois/années de traitement (en médiane 19 mois sous osimertinib en première ligne). Les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) de l'*EGFR*, sont également fréquemment amplifiés (amplification de l'allèle muté) ce qui pourrait potentialiser la tumorigénèse et favoriser la résistance aux médicaments (151). La sélection d'un clone porteur d'une mutation supplémentaire de l'EGFR sur le site de fixation de l'ATP ("mutation gatekeeper") constitue le mécanisme de résistance secondaire le plus fréquent, dit "dépendant de l'oncogène"(152). La mise en jeu de voies de signalisation parallèles (mécanisme bypass) passant par l'amplification d'autres RTK (ErBb2, erBB3, c-Met) (153) ou porteurs d'une activation par fusion d'un autre oncogène (ALK, Ret...), la sélection de clones porteurs d'une mutation activatrice d'aval (B-RAF, MEK...) sont aussi des mécanismes classiques de résistance acquises (154–156). La sélection d'un clone d'histologie différente, soit carcinome épidermoïde par activation du facteur de transcription SOX2, soit carcinome à petites cellules

(par mutation de TP53 et inactivation de Rb) constitue un troisième mécanisme de résistance dont on peut rapprocher la sélection d'un clone mésenchymateux très indifférencié et au potentiel agressif et invasif accru (157–159).

C'est dans ce dernier care de figure, à côté de l'activation des voies Notch/Wnt, que de nombreuses études ont établi un lien entre l'activation de YAP/TAZ et la résistance aux TKI, par le biais, entre autres, d'une transition épithélio-mésenchymateuse.

Un article de l'équipe de Marc Ladyani, rapporte une amplification du gène YES, codant pour la tyrosine kinase activant YAP par phosphorylation de sa tyrosine 357, dans 5 cas de résistance acquise sous TKI de l'EGFR, dont quatre n'étaient porteurs d'aucun autre mécanisme de résistance, et deux pour lesquels un prélèvement pré-thérapeutique était disponible mais n'avait pas d'amplification YES détectable, suggérant un mécanisme de sélection clonal sous pression thérapeutique (160). Une telle amplification est d'ailleurs retrouvée dans deux cas de résistance acquise au TKI de ALK sur 17 testés. Un crible génétique de mutant de cellules PC9 résistantes à l'afatinib, a d'ailleurs retrouvé des clones avec une telle amplification, suggérant à nouveau l'implication de la voie YAP dans cette résistance acquise aux inhibiteurs de l'EGFR (bien que les auteurs n'aient pas testé de fait la signature YAP/TEAD dans cet article).

Même si les mécanismes de résistance sont encore mal compris, il semblerait que YAP/TAZ induisent une résistance aux ITK notamment en augmentant l'expression de d'AXL et de ERBB3. Ainsi, l'équipe de *Hsu et al.* a démontré que la surexpression forcée de YAP par transfection d'un plasmide YAP, favorisait la résistance à l'erlotinib dans la lignée cellulaire HCC827 sensible à l'erlotinib (adénocarcinome avec délétion de l'exon 19). Dans les cellules HCC827 transfectées par le plasmide YAP, l'activité du rapporteur GTIIC et l'expression des gènes AREG et CTGF en aval de Hippo sont augmentés de manière significative ($p < 0,05$), tout comme l'expression de l'ARNm ERBB3 ($p < 0,05$). L'inhibition de YAP par un petit ARN interférent (siRNA) ou par la verteporfine (inhibiteur non spécifique de YAP) a augmenté la cytotoxicité de l'erlotinib dans une lignée cellulaire résistante à l'erlotinib (lignée H1875 EGFR+ avec mutation de résistance T790M+). Par ailleurs, dans les cellules H1975 transfectées par un siARN YAP, l'activité du rapporteur GTIIC et l'expression des gènes cibles de YAP, AREG et du CTGF, sont diminués de manière significative ($p < 0,05$) (148).

YAP/TAZ et réponse à la chimiothérapie

La chimiothérapie est une stratégie thérapeutique qui vise à inhiber la division cellulaire de façon non spécifique, par interaction directe avec l'ADN et l'inhibition de la réplication de cet ADN ou encore par l'inhibition de la polymérisation/dépolymérisation des microtubules impliqués dans le déroulement de la mitose et la séparation des chromosomes comme de la cytokinèse. Une littérature parfois contradictoire et évasive quant aux mécanismes fondamentaux relie la signalisation Hippo-YAP/TAZ à la résistance à la chimiothérapie dans de nombreux cancers solides (**FIGURE 16**) (143).

Deux des grandes familles de traitements cytotoxiques utilisées en clinique chez les patients avec cancer pulmonaire, en association avec les sels de platine, sont les anti-microtubules et les anti-folates. Les anti-microtubules, comme évoqué plus haut, bloquent la mitose en perturbant la conformation des microtubules, donc la séparation des chromosomes puis la division du corps cellulaire (cytokinèse), aboutissant à des aberrations chromosomiques et du nombre de noyaux dans les cellules filles, conduisant à l'apoptose. Les taxanes (Paclitaxel et Docetaxel) sont des chimiothérapies très utilisées dans de nombreux cancers solides (poumon, sein, ovaire, prostate, *etc.*). Les antimétabolites constituent une autre classe de chimiothérapie interférant avec la prolifération et la survie cellulaire par inhibition de la synthèse des bases nucléosidiques constitutives de la molécule d'ADN. Le 5-FU et la gemcitabine, deux analogues nucléosidiques respectivement de l'uracile et de la pyrimidine, sont les plus connus et sont fréquemment utilisés dans diverses tumeurs solides (sein, ovaire, pancréas, poumon, colon *etc.*). Les anti-folates, comme le pemetrexed ou le méthotrexate, antagonisent la synthèse nucléosidique, en inhibant pour le premier, désormais largement utilisé chez les patients avec adénocarcinome pulmonaire, pas moins de trois enzymes. Il inhibe en effet la thymidylate synthase (TS), nécessaire à la synthèse des bases pyrimidiques, la dihydrofolate reductase (DHFR), deuxième enzyme intervenant après la TS dans la synthèse des pyrimidines, et enfin la glycinamide ribonucleotide formyltransferase (GARFT), enzyme nécessaire à la synthèse des bases puriques, toutes ces enzymes utilisant le tétra-hydrofolate (acide folique communément) comme "brique" de base pour leur action.

Un premier mécanisme de résistance à ces chimiothérapies impliquant YAP/TAZ a été associé à la dérégulation de microRNAs (miRNA) régulant l'expression de protéines de la voie Hippo (MST1, SAV1, LATS2, MOB1, YAP). Ainsi, le miRNA 363 semble être régulé à la hausse dans les cellules cancéreuses ovariennes, conférant une résistance aux taxanes en ciblant la transcription de l'ARNm de LATS2 (161). Cependant il ne s'agit pas du seul

mécanisme impliqué puisque les anti-microtubules sont susceptibles d'activer la kinase CDK1, qui en phosphorylant LATS, l'active, LATS à son tour phosphorylant et inactivant l'isomérase anti-apoptotique Pin1, la cellule étant alors capable d'enclencher une réponse apoptotique aux taxanes dans des lignées de cancer pulmonaires (162). Ainsi la perte de LATS2 peut-elle induire une résistance aux taxanes. Enfin, il semblerait que certains gènes cibles de YAP/TAZ/TEAD contribuent à la résistance aux taxanes. En effet, il a été rapporté dans des tumeurs ovariennes et hépatiques, une augmentation de l'expression des transporteurs ABCs entraînant une majoration de l'efflux des drogues (163,164). Enfin, YAP/TAZ peuvent également favoriser indirectement la résistance aux taxanes par l'intermédiaire de cibles transcriptionnelles canoniques, CTGF et CYR61, qui inhibent l'apoptose induite par les taxanes en régulant à la hausse l'expression de l'apoptose (Bcl-xL, cIAP1 et Survivin) (122).

Les agents endommageant l'ADN sont des composés qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose en soit en alkylant directement l'ADN (cisplatine, témolozomide, etc.), soit en inhibant les topoisomérases (doxorubicine, étoposide). La signalisation Hippo a aussi été liée à la résistance aux agents endommageant l'ADN dans de nombreuses études(165–168). Les mécanismes de résistances à ces traitements semblent assez similaires aux autres chimiothérapies. Des études ont rapporté une régulation négative de MST1/Hippo suite à un traitement par doxorubicine ou cisplatine (169). Par ailleurs, AJUBA, régulateur négatif de LATS, semble être augmenté dans les cellules cancéreuses utérines résistantes au cisplatine(170).

Enfin, plusieurs équipes ont déjà prouvé qu'un niveau élevé d'expression de la bêta-tubuline de classe III (TUBB3), isoforme normalement neuronale et d'expression restreinte lors de l'embryogénèse, dans les cellules tumorales était corrélé à une résistance à la chimiothérapie (paclitaxel, vinorelbine) et à une diminution de la survie des patients atteints d'un CBNPC (56,171,172). *G. Levallet et al.* ont ainsi étudié la valeur pronostique et prédictive de l'expression de la β -tubuline III déterminée par immunohistochimie, dans 412 échantillons de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) provenant de patients à un stade précoce ayant reçu une chimiothérapie néoadjuvante (à base de paclitaxel ou de gemcitabine) dans le cadre d'un essai de phase III (IFCT-0002). Une expression élevée de la protéine TUBB3 était associée aux carcinomes non épidermoïdes ($p < 0,001$) et à l'existence d'une mutation activatrice de K-Ras ($P < 0,001$). Par ailleurs, l'expression élevée de TUBB3 était corrélée à un pronostic plus sombre : survie globale médiane de 71,7 mois pour les patients positifs pour TUBB3 et de plus de 84 mois dans le groupe TUBB3 négatif contre 3

[HR, 1,58 ; intervalle de confiance à 95 % (IC), 1,11-2,25)]. L'expression de TUBB3 a été associée à la non-réponse à la chimiothérapie (HR ajusté, 1,31 ; 95% CI, 1,01-1,70 ; P = 0,044) mais n'avait pas de valeur prédictive (taxane vs. gemcitabine). Cette étude est la première à identifier les mutations de K-Ras comme déterminant de l'expression de TUBB3, un marqueur de chimiorésistance (56). Dans plusieurs études avec données de RNAseq ou de chipSeq, TUBB3 apparaît comme une cible transcriptionnelle de YAP.

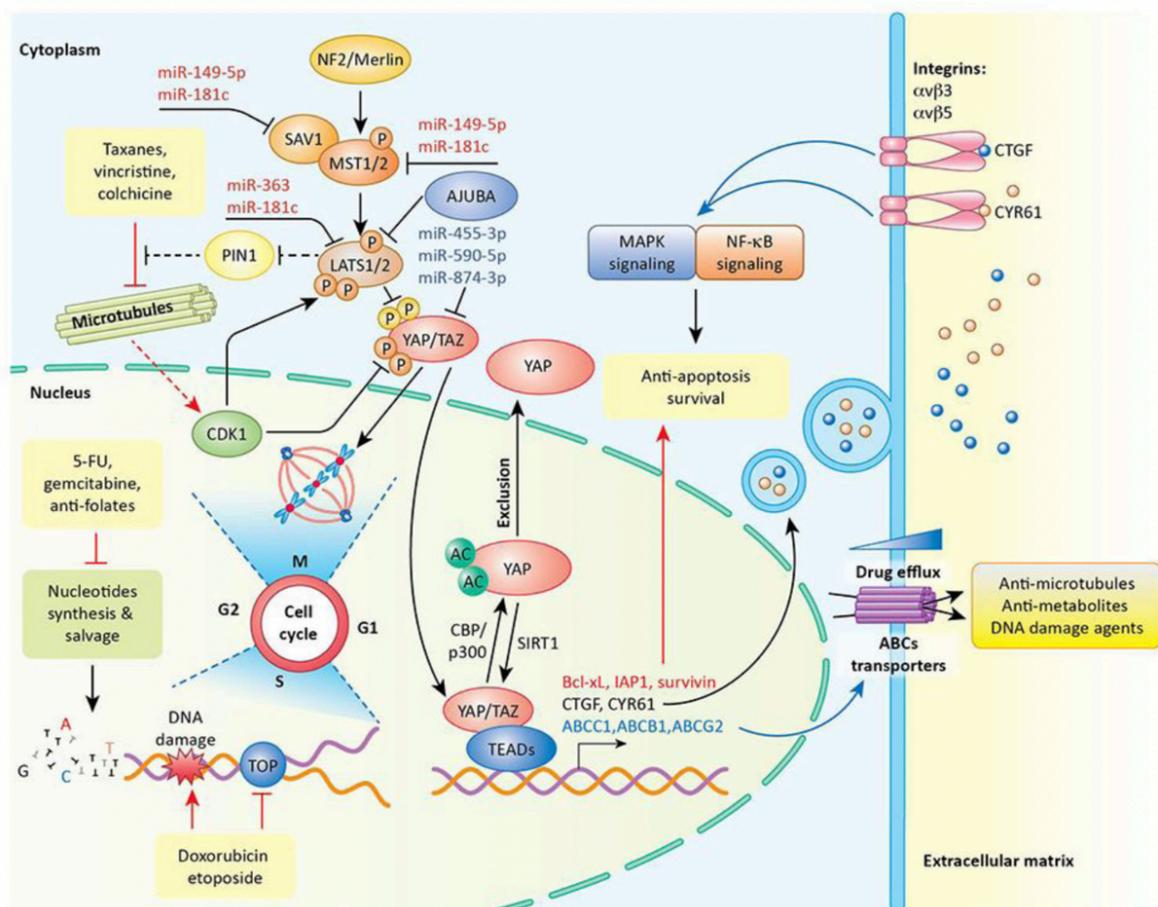


FIGURE 16 - YAP/TAZ et résistance à la chimiothérapie

D'après Nguyen et al. Trends cancer, 2019

YAP/TAZ et réponse à l'immunothérapie

PD-L1 et CTLA-4 sont des marqueurs de surface cellulaire exprimés sur les cellules tumorales qui se lient à leurs récepteurs correspondants (PD-1 et B7) sur les cellules T cytotoxiques (CTL), provoquant l'épuisement des cellules T et empêchant la destruction de la tumeur par ces CTL.

Les anticorps monoclonaux ciblant PDL1 (Atezolizumab, durvalumab...), anti-CTLA-4 (Ipilimumab), ou PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Cemiplimab...) sont utilisés avec succès pour réactiver les cellules T dans beaucoup de cancers solides, comme les cancers pulmonaires ou le mélanome. De multiples études ont identifié PD-L1 comme une cible transcriptionnelle directe de YAP/TAZ/TEAD, la surexpression de PD-L1 sur la cellule tumorale sous l'action transcriptionnelle de YAP/TEAD induisant ainsi une inactivation des lymphocytes T PD-1+ et une résistance à l'immunothérapie (173). Par ailleurs, le complexe YAP/TAZ/TEAD entraînant la transcription des gènes codant pour certaines cytokines comme CSF1-3, IL-6, CXCL-5, permettant la polarisation et le recrutement des cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) et de macrophages associés aux tumeurs (TAM) qui inhibent la réponse immunitaire T et favorisent donc aussi la résistance à l'immunothérapie (174).

5. Inhibiteurs de la voie Hippo/YAP : nouvelle cible thérapeutique ?

Depuis la découverte de la voie Hippo/YAP et de son implication dans la carcinogénèse, et plus récemment dans la résistance aux thérapeutiques du cancer, de nombreux travaux ont été réalisés à la recherche de molécules capables d'inhiber ces propriétés (175,176). Les différentes molécules interagissant avec la voie Hippo sont représentées sur la **FIGURE 17** (176). Seuls les principaux inhibiteurs de la voie Hippo/YAP seront détaillés dans ce paragraphe.

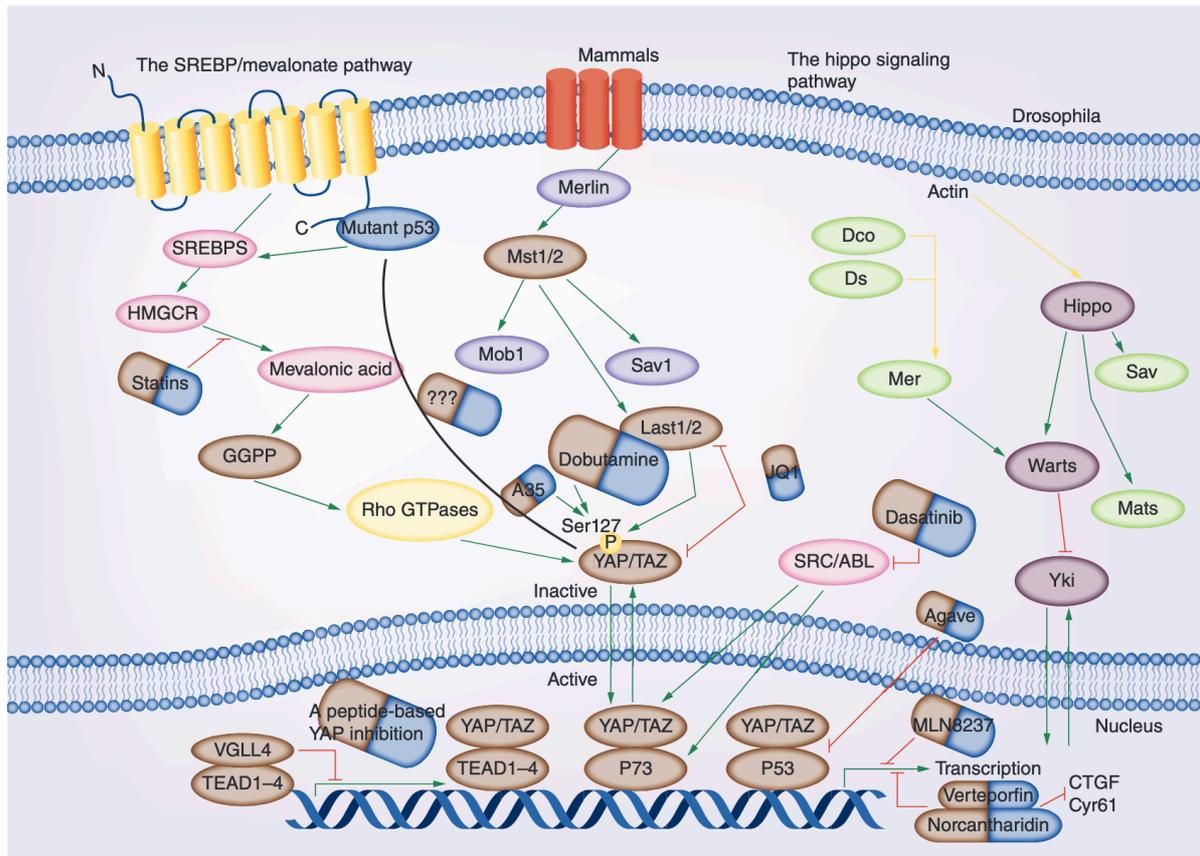


FIGURE 17 - Inhibiteurs de la voie Hippo/YAP

D'après Tang et al. Future Oncol. 2019 (176)

Verteporfine

Les travaux de l'équipe de *Liu-Chittenden et al.* ont permis d'identifier la Verteporfine (VP) comme le premier potentiel inhibiteur de la voie Hippo (177). La Verteporfine, dérivé de la benzoporphyrine, est généralement utilisée dans la thérapie photodynamique de la dégénérescence maculaire néovasculaire. Cependant, ce traitement a été de multiples fois décrit comme un inhibiteur pharmacologique *in vitro* et *in vivo* de YAP (178). Les résultats montrent que la VP se lie à YAP et augmente l'accessibilité de la trypsine à YAP, probablement en modifiant la conformation de YAP, induisant donc une protéolyse de YAP. Le photosensibilisateur VP a été montré comme un puissant inhibiteur de la croissance cellulaire dans les cellules de rétinoblastome en perturbant la signalisation YAP-TEAD (179). De même, il a été retrouvé que la VP conduisait à l'inhibition de la prolifération d'une manière dépendante du temps et de la dose, et à la suppression des capacités migratoires et invasives dans des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes. Des analyses de fractionnement

subcellulaires ont confirmé par ailleurs une rétention cytoplasmique de YAP dans ces cellules traitées par VP. Enfin, la VP régule l'expression des facteurs immuno-régulateurs en bloquant le processus transcriptionnel de YAP/TAZ. *In vivo*, VP a exercé un effet remarquable sur la croissance tumorale chez les souris OVCAR8 xénotransplantées, avec une diminution significative des nodules tumoraux (180). Malgré tout cela, la VP ne pourra probablement jamais être utilisée chez l'homme comme anti-tumoral du fait de ces propriétés intrinsèques. D'une part, la VP est une molécule photo-activable et nécessite donc d'être manipulée à l'abri de la lumière. De plus, la VP semble être une molécule difficilement soluble et avec une stabilité médiocre. Enfin, à visée anti-tumorale chez l'homme, la VP doit être utilisée à des doses importantes pour être efficace sur la signalisation YAP, et donc potentiellement toxiques. D'autre part, la VP semble avoir des propriétés protéotoxiques, entraînant une accumulation intra-cellulaire de protéines à haut poids moléculaire avec une mort cellulaire indépendante de la voie YAP.

Peptide synthétique dérivé de VGLL4

Le peptide synthétique mimétique de VGLL4 a été décrit comme une molécule prometteuse entrant en compétition avec les facteurs de transcription TEAD par le biais du domaine TDU situé à son extrémité C-terminale, inhibant ainsi l'activité de YAP. De fait VGLL4 est un facteur de transcription étudié principalement chez la drosophile, capable d'interagir avec YAP. Cet inhibiteur peptidique de YAP était efficace dans des modèles murins sur des cellules cancéreuses gastriques (181). La modélisation de son interaction avec YAP sert de nos jours pour la conception d'inhibiteurs de l'interaction YAP/TEAD, mais ce peptide n'a pas connu de développement clinique plus poussé.

Dasatinib

Le dasatinib, inhibiteur de 2^{ème} génération, de la kinase ABL, mais aussi des tyrosine kinases SRC mais aussi YES, est un traitement classique de leucémie myéloïde chronique (LMC) BCR-ABL+. Il a été démontré que le dasatinib conduit à la dégradation protéosomale de YAP et TAZ en inhibant la kinase YES qui phosphoryle la tyrosine 357 de YAP, indispensable à sa conformation active, capable d'interagir avec TEAD (182,183)(184). Le dasatinib est cependant capable d'inhiber une demi-douzaine d'autres kinases de la famille SRC

avec donc des effets indésirables potentiels liés à ces inhibitions "off-target" et notamment il a été impliqué dans la survenue d'HTAP sévère chez des patients avec LMC (185).

Statines

Bien connues pour leur rôle majeur dans le traitement de l'hyper-cholestérolémie, les statines ont été aussi décrites comme molécule pouvant inhiber la localisation nucléaire de YAP/TAZ par inhibition de l'HMG-Coa réductase, enzyme de la voie des mévalonates. Cette voie est essentielle pour la prénylation (farnesylation ou géranyl-géranylation) des protéines RHO (A, B, et C) et donc à la régulation de la polymérisation du cytosquelette dont a vu plus haut l'importance dans l'activation de YAP et plus précisément sa translocation nucléaire. Même si les statines semblent être une piste intéressante, leur efficacité semble être plus convaincante *in vitro* qu'*in vivo* (186). Cet effet, très indirect et peu spécifique (d'autres protéines phényles pourraient être inhibées) assez modéré observé *in vivo*, suggère que le seuil de la concentration minimale pour obtenir une efficacité anti-tumorale doit plus important et donc comporte un risque d'effets secondaires non négligeable.

A35

En inhibant les topoisomérases, A35 a montré une certaine efficacité pour induire une phosphorylation de YAP sur sa sérine 127 ce qui bloque sa translocation nucléaire. Des études ont pu en effet prouver que l'administration de cette molécule entraînait un taux de YAP nucléaire plus faible et par conséquent une diminution d'expression des gènes cibles de YAP. A35 permet d'inhiber l'apoptose, en induisant un arrêt à la phase G2/M du cycle cellulaire (187). Ce mode d'action est cependant très indirect et n'a pas conduit à un développement clinique.

Dobutamine

La dobutamine, agoniste des récepteurs β hautement sélectif, a pour effet d'augmenter la contractilité du myocarde et le débit cardiaque. Cette molécule a prouvé une certaine efficacité antitumorale *in vitro* dans certaines lignées cancéreuses notamment d'ostéosarcomes (188). Elle a été identifiée comme inhibiteur de la transcription induite par YAP dans un crible cellulaire, mais de façon apparemment indépendante de la voie Hippo (189). Elle induirait la phosphorylation de YAP et sa séquestration dans au niveau des

jonctions serrées (190). De fait la dobutamine fait sortir YAP/TEAD du noyau et entraîne une localisation aux jonctions serrées, ou YAP interagit avec YES et l'occludine, protéine majeure des jonctions serrées, favorisant ainsi la polarisation apico-basale épithéliale de cellules pancréatiques (191).

JQ1

JQ1 est un inhibiteur des membres de la famille des protéines BET (bromodomain and extraterminal domain), qui sont des régulateurs généraux de la conformation de la chromatine, et à ce titre des régulateurs de la transcription, qui agissent en recrutant des facteurs de transcription au niveau de séquences régulatrices de la transcription, promotrices (proches du gène cible) ou séquences enhancer et super-enhancers très éloignées du gène cible. De fait l'équipe de Stefano Piccolo a montré que YAP/TAZ est capable de recruter des protéines BET telle BRD4 au niveau de la chromatine. BRD4 est un régulateur de la transcription dépendante de l'ARN polymérase II, et de fait, le JQ1 inhibe la transcription de cibles transcriptionnelles de YAP/TAZ, induisant une inhibition de la prolifération cellulaire (192). Il existe des complexes multimoléculaires associant YAP/TAZ, TEAD, des protéines BET telle BRD4, CDK7/ CDK9 des kinases associées à la régulation générale de la transcription et qui phosphorylent YAP/TAZ de façon Hippo-indépendante, inhibant ainsi la dégradation via ubiquitination, un coactivateur général de la transcription MED1, le complexe transcriptionnel AP-1 (complexe de protéines FOS- avec des protéines JUN), des histones acétylases (HAT) telles p300, des histones méthyl-transférase telle KMT2D, qui s'associent à des séquences promotrices (sites consensus TEAD), enhancers, ou super-enhancers en amont de cibles transcriptionnelles de YAP/TEAD, entraînent une ouverture et un changement de conformation de la chromatine, propice à la transcription du gène cible d'aval, laquelle peut-être inhibée par JQ1 dont l'effet est d'induire un détachement de BRD4 de ce complexe. JQ1 est capable de contrecarrer la résistance YAP-dépendante de cellules de mélanome au vemurafenib, un inhibiteur de B-Raf, témoignant de son action d'inhibiteur fonctionnel de YAP. Ces observations expérimentales expliquent pourquoi 90% des sites consensus de fixation YAP/TEAD sur l'ADN se trouvent en fait très loin du site d'initiation de la transcription des gènes cibles de YAP/TEAD puisque ces complexes multi-moléculaires sont capables en induisant changement conformationnel de la chromatine à type de boucle, de faire interagir des séquences cis- enhancer très éloignées de leur gène cible, d'où d'ailleurs une certaine difficulté à définir les signatures transcriptionnelles de YAP/TEAD qui sont

particulièrement fournies (plusieurs centaines de gènes). L'activation transcriptionnelle YAP/TEAD-dépendante découle aussi de conditions permissives puisque le complexe chromatinien décrit ci-dessus comprend aussi des sous-unités du complexe SWI/SNF dont ARID1A nécessaires à son activité. Cette association avec ARID1A peut être défaite en cas de stress mécanique (matrice rigide, densité cellulaire), conditions banales au cours de la prolifération tumorale, car ARID1A lie l'actine filamenteuse nucléaire et le stress mécanique a pour effet de relarguer ARID1A du complexe. Ainsi, il faudrait, pour activer le programme transcriptionnel YAP/TEAD non seulement une accumulation nucléaire au sein d'un complexe chromatinien, mais aussi une étape permissive passant soit par la mécano-transduction, soit par une altération génétique, puisque des mutations faux-sens de ARID1A sont fréquentes dans les cancers. Pour autant, ici encore l'effet de JQ1 sur YAP/TAZ est indirect, inhibant fonctionnellement mais pas directement la transcription passant par YAP/TEAD.

MLN8237

MLN8237 est un inhibiteur de deuxième génération de la kinase Aurora, semble être efficace dans plusieurs tumeurs solides et hémopathies malignes et a été testé sur des lignées de neuroblastomes et sarcomes d'Ewing ainsi que les modèles PDX correspondants (193). La kinase Aurora est capable d'interagir directement avec YAP, or Aurora est essentielle en fin de phase G2 du cycle cellulaire pour le recrutement de complexes de cycline B1 et CDK1 aux centrosomes ce qui est indispensable pour l'entrée en mitose. Son expression est corrélée à celle de YAP sur des biopsies de cancer pulmonaires (193) et sa déplétion par siARN entraîne une diminution de l'expression protéique de YAP dans des lignées de cancer pulmonaires A549 et H1299. La surexpression de Aurora dans ces lignées augmente l'expression des cibles transcriptionnelles de YAP (CTGF, CYR61). Aurora est capable de phosphoryler la tyrosine 357 de YAP (qui est aussi cible de YES), indispensable à l'activation de YAP dans le noyau. Le MLN8237 en inhibant Aurora est donc là encore un inhibiteur fonctionnel indirect de YAP et son activité est corrélée à l'inactivation YAP/TAZ.

TED-347

Pendant la réalisation de ce travail de thèse la synthèse de plusieurs inhibiteurs directs de YAP/TEAD a été rapportée (194). TED-347 est une petite molécule dont la synthèse a été modélisée sur ordinateur à partir de la structure tridimensionnelle du complexe YAP/TEAD (195) de façon à inhiber la palmytilation de TEAD, en se liant de façon covalente à un résidu cystéine 367 très conservé, qui fixe le palmitate, ce qui aboutit à une inhibition allostérique de l'interaction YAP/TEAD4, boquant l'activité transcriptionnelle du complexe et la viabilité de sphéroïdes de glioblastomes. Ainsi que nous le verrons dans ce travail de thèse, l'activité de ce composé ne le prédestine sans doute pas à un avenir clinique puisque sa constante d'inhibition est de 10,3 μmol , avec une concentration efficace médiane (EC50) de 5,9 mM pour TEAD4 ce qui suppose des doses élevées de l'ordre d'une dizaine micromolaire pour une activité *in vivo* si tant est que son profil de distribution et de métabolisme soit favorable. Le TED-347 est disponible commercialement (catalogue MedChem).

K-975 & MYF-03-69

Pendant la réalisation de ma thèse l'isolement de deux autres molécules, toutes les deux ciblant le même site de palmytilation de TEAD ont été publiés. Le MYF-03-76 a une activité d'inhibition de la transcription dès la concentration de 100 nM et une IC50 de 81 à 130 nM dans des lignées de mésothéliome avec activation de YAP, en 2D ou sous forme de sphéroïdes (196). Le K-975 a été conçu de la même façon pour se lier de façon covalente à la poche palmitate de TEAD, avec une IC50 autour de 100 / 200 nM et une possible efficacité *in vivo* sur des modèles de PDX orthotopiques de mésothéliome (197). Ces deux composés plus récents n'ont été disponibles commercialement que très récemment.

6. Collaboration avec le laboratoire pharmaceutique Inventiva

A l'occasion de son intégration dans l'unité INSERM U830 de l'institut Curie, dirigée par le Dr. Olivier Delattre, le Pr. Zalzman a initié une collaboration avec la société biopharmaceutique Inventiva spécialisée dans le développement clinique de petites molécules actives administrées par voie orale dans le domaine de l'oncologie, de la fibrose ou encore des maladies lysosomales. Le principal programme d'Inventiva en oncologie est basé sur des molécules développées et brevetées qui ont démontré une activité antiproliférative *in vitro* substantielle dans diverses cellules cancéreuses et qui pourraient avoir un potentiel thérapeutique important pour traiter le cancer du mésothéliome malin et les formes graves de cancer du poumon, du côlon, des ovaires et de l'estomac.

Une subvention ANR 2017 a permis de développer le projet "Hippocure" fruit du consortium formé par l'U830 (G. Zalzman), Inventiva et le Laboratoire d'Investigation Préclinique (LIP) du Dr. Didier Decaudin à l'Institut Curie. Le but de cette collaboration entre Inventiva et l'Institut Curie était donc de trouver le meilleur candidat pour empêcher la formation du complexe transcriptionnel YAP/TEAD, et par conséquent réduire l'expression des gènes cibles du complexe YAP/TEAD et entraîner des effets antiprolifératifs et/ou anti-métastatique (migration cellulaire) sur des lignées de cellules cancéreuses ayant une activation de la voie YAP. Malheureusement, la structure des différentes molécules testées au cours de nos travaux n'a jamais été partagée par le laboratoire puisqu'elles sont issues d'un crible chimique maison de composés par la suite optimisés structurellement, et leur structure est donc couverte par un brevet industriel. Ces molécules n'ont cependant pas été dessinées selon leur capacité à interagir avec la poche palmitate de TEAD et la façon dont ils interagissent avec YAP ou TEAD n'est pas connu de nous si tant est que Inventiva l'ait déterminé.

Le Dr. Paula Abreu, stagiaire postdoctorale au sein de l'équipe Inserm U830 a pu ainsi tester *in vitro* l'effet antiprolifératif d'une demi-douzaine de composés issus d'un crible de Inventiva. Pendant 2 ans, elle a donc pu étudier l'effet de ces inhibiteurs YAP/TEAD sur la localisation subcellulaire (noyau ou cytoplasme) de YAP, la migration 2D, et leur impact au niveau transcriptionnel dans des lignées de cancer bronchiques non à petites cellules (CBNPC) et des lignées de mésothéliome avec activation de YAP (telle que jugée sur la localisation nucléaire de YAP même à forte densité et sur la transcription des cibles classique de YAP). Au préalable, le laboratoire pharmaceutique avait réalisé des tests de Co-Immunoélectrophorèse (CoIP) et de Proximity Ligation Assay (PLA) sur des lignées

cellulaires YAP et/ou TAZ dépendantes afin de confirmer l'efficacité des composés sur l'inhibition d'interaction YAP/TAZ/TEAD1. Ces résultats sont résumés sur la **FIGURE 18**.

Les expériences de co-immunoprécipitation (co-IP) avec un anticorps pan-TEAD suivi d'un Western avec un anticorps YAP, montrent que le composé le plus actif de la série que nous avons eu en mains, inhibe l'interaction de YAP et TEAD, puisque la quantité de YAP immuno-précipité décroît avec la dose de composé utilisé pour être quasi nulle à 3 micromolaire. Des expériences complémentaires (non montrées) prouvent que cette diminution de YAP correspond non seulement à une perte d'interaction mais aussi à une dégradation du YAP déplacé de son interaction avec TEAD puisque, la diminution de YAP n'est plus observée en présence d'un inhibiteur classique du protéasome le MG-132. Les PLA montre, dans des noyaux de cellules de mésothéliome H2052 dans lesquelles YAP est activé (mutation de NF2) la disparition de l'interaction nucléaire YAP/TEAD (panel de gauche) en présence du composé Inventiva. Inventiva a par ailleurs étudié l'impact sur la transcription évaluée par qRT-PCR des gènes cibles classique de YAP d'un traitement par le composé IV162640 (**FIGURE 19**) et ainsi pu montrer que ce composé diminuait efficacement l'expression de la plupart des gènes cibles classiques de YAP/TEAD.

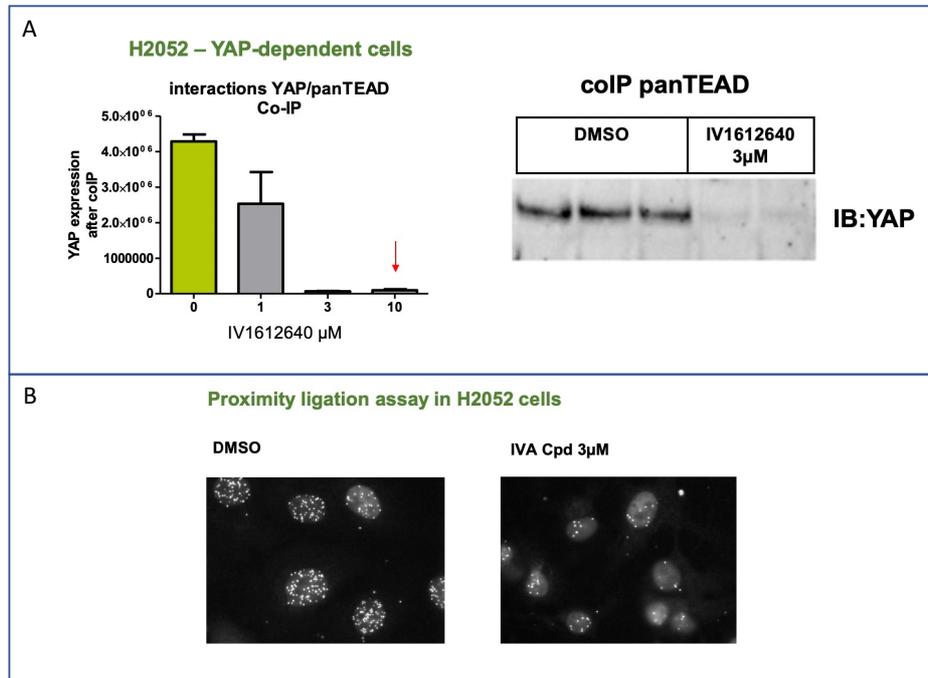


FIGURE 18 - Interactions protéiques YAP/TAZ-TEAD1 en présence/absence du composé IV1612640

Propriété du laboratoire Inventiva.

- A. Expression de YAP après Co-Immunoprécipitation panTEAD dans la lignée mésothéliale H2052 (Western Blot et quantification)
- B. Proximity Ligation Assay entre YAP et TEAD1 dans la lignée mésothéliale H2052

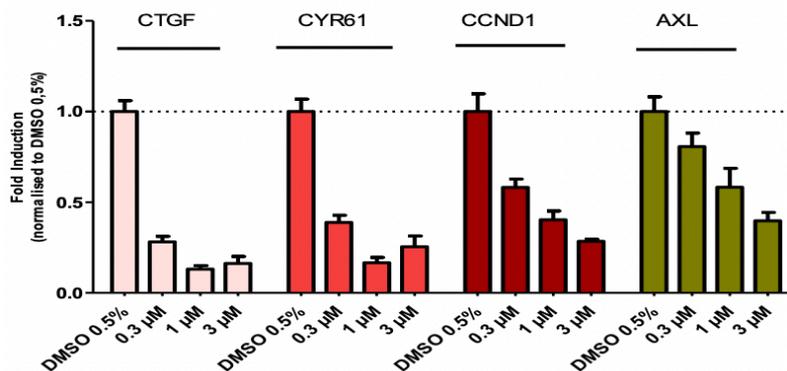


FIGURE 19 - Expression des principaux gènes cibles de YAP/TEAD en présence ou non du composé IV162640

Propriété du laboratoire Inventiva.

Par ailleurs, le Dr. Abreu a étudié l'effet de ces drogues en synergie avec d'autres composés anti-tumoraux, tels que le tramétinib ou avec l'association Cisplatine/Pemetrexed. Les résultats du Dr. Abreu sont détaillés dans la partie « **RESULTATS** » de ce manuscrit. L'équipe de D. Decaudin n'a pas trouvé, sur une collection de xenogreffes sur souris nude de CBNPC avec méthylation de RASSF1A et YAP nucléaire, d'effet significatif des composés Inventiva en monothérapie, mais une synergie spectaculaire en présence de tramétinib dans les modèles K-Ras mutés, ou en association avec le pemetrexed dans des adénocarcinomes K-Ras sauvages (mais méthylés RASSF1A). Ces résultats précliniques ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

C. OBJECTIFS

Mon projet de recherche avait pour but d'étudier l'implication de l'activation de YAP dans l'acquisition d'une résistance à la chimiothérapie par paclitaxel dans le cancer pulmonaire puisque l'implication de la voie YAP dans la chimiorésistance acquise apparaissait moins documentée que dans la résistance secondaire aux TKI en cas de mutation addictive.

Une des premières hypothèses était que la résistance acquise à la chimiothérapie par paclitaxel de cellules issues de lignées de cancer bronchique non à petites cellules passait par une augmentation de l'activité de YAP. Trois approches complémentaires ont permis de tester cette hypothèse: *i)* l'estimation de l'activité de YAP par un test fonctionnel utilisant un plasmide contenant les séquences promotrice de TEAD en amont du gène rapporteur de la luciférase (Dual Luciferase Assay): la présence de YAP activé dans le noyau de cellules de lignées isogéniques parentales et résistantes au paclitaxel de CBNPC (A549 Res. & Par. et HCC827 Res. & Par.) serait alors proportionnelle à la bioluminescence induite par la fixation de YAP sur les séquences TEAD. *ii)* Cette approche a été complétée par des expériences d'immunofluorescence dans l'objectif de quantifier la fraction de YAP nucléaire par rapport à la fraction de YAP cytoplasmique (YAP étant actif dans le noyau du fait de son rôle de co-régulateur transcriptionnel) dans ces mêmes cellules. *iii)* Enfin, une appréciation quantitative et qualitative de l'expression des ARNm des cibles transcriptionnelles de YAP par analyse transcriptomique dans les lignées A549 sensibles et résistantes a permis de corrélérer la concentration de ces cibles avec l'état d'activation de YAP dans ces lignées.

Le deuxième objectif avait pour but d'étudier l'impact du composé pharmaceutique CV2460, inhibiteur de l'interaction YAP/TEAD, développé par la compagnie Inventiva (ANR 2018), sur l'activation de YAP dans des cellules de CBNPC parentales et résistantes au paclitaxel. De façon similaire aux travaux décrits ci-dessus, l'activité de YAP a été appréhendée par Dual Luciferase, immunofluorescence et analyse transcriptomique, en présence ou non du composé inhibiteur de l'interaction YAP/TEAD dans des lignées parentales et résistantes de CBNPC (A549 Res. & Par., HCC827 Res. & Par.).

Dans un troisième temps, j'ai voulu étudier l'effet du composé CV2640 sur la réversibilité de la chimiorésistance au taxol en lien avec l'inhibition de YAP. Pour se faire, nous avons réalisé des expériences d'IC50 en présence de paclitaxel et du composé dans des lignées A549 parentales et résistantes de CBNPC. Pour étudier l'impact des différentes drogues sur des cellules cancéreuses, nous avons aussi utilisé un modèle expérimental que notre équipe a développé depuis 3 ans, en collaboration avec l'équipe de Stéphanie Descroix

de l'Institut Pierre Gilles de Gennes (IPGG, UMR168 Curie-IPGG), visant à reconstituer *in vitro* (*ex-vivo*) un microenvironnement tumoral le plus complet possible sur puce microfluidique. Ce système de "cancer-on chip" nous a permis d'ensemencer, dans une matrice 3D de collagène, des cellules tumorales (soit lignée cellulaire, soit cellules issues de tumeurs fraîches de patients de l'hôpital Bichat), et de comparer l'efficacité des différentes drogues entre elles, grâce à la mesure de la mort cellulaire et notamment par apoptose. Une méthode automatisée et brevetée appelée STAMP pour compter ces événements de mort dans la puce a été développée en collaboration avec le Pr. Eugenio Martinelli et le Dr. Arianna Mencattini de l'Université de Rome (Italie), permettant de cartographier la mort dans l'espace et le temps(7). L'étude de la mort cellulaire (révélée par un marqueur fluorescent) des cellules par analyse vidéo microscopique en présence ou non du composé anti-YAP et en présence de paclitaxel devait permettre d'appréhender l'effet de l'inhibition de YAP sur la chimio-sensibilité au paclitaxel sur nos lignées cellulaires ou sur des tumeurs issues de patients.

RESULTATS

Afin d'étudier l'effet des différents composés Inventiva CV2640, nous avons tout d'abord étudié leurs effets sur la localisation nucléaire de YAP en immunofluorescence et sur le potentiel métastatique cellulaire grâce à des tests de migration 2D. Ces premières expériences nous ont permis de sélectionner l'inhibiteur de YAP/TEAD apparaissant le plus actif : le CV2640. En effet, nous avons objectivé que ce composé entraînait une diminution significative du ratio nucléaire/cytoplasmique de YAP et une diminution de la vitesse de migration cellulaire. Nous avons dans un deuxième temps, souhaiter reproduire de façon pharmacologique les résultats obtenus par l'équipe de *Bivona et al.* (2), par ARN interférence de YAP, ayant permis de décrire un effet de léthalité synthétique entre les voies YAP et MAP-Kinase, en associant cette fois simultanément notre anti-YAP et un anti-MEK dans des cellules avec mutation activatrice de K-RAS ou B-RAF. Nos expériences ont été là aussi concluantes, puisque la présence du CV2640 en association avec du tramétinib dans notre lignée cellulaire A549 entraînant une nette diminution de l'IC50 de ce dernier, récapitulant les résultats de Bivona. Ces expériences nous ont donc poussé à utiliser cet inhibiteur dans des paires de lignées cellulaires d'adénocarcinome pulmonaire (parentales et rendues résistantes au paclitaxel) afin d'étudier l'effet de cet inhibiteur sur l'activité de YAP, sur sa localisation nucléaire en phase de croissance exponentielle à faible confluence, et sur la réversibilité de la chimiorésistance au paclitaxel. De façon intéressante, nous avons retrouvé une hausse de l'activité de YAP et une localisation nucléaire prédominante dans nos cellules résistantes, et une efficacité significative du composé CV2640 pour inhiber la localisation nucléaire comme l'activité YAP. Par ailleurs, nos tests d'IC50 ont pu confirmer que l'ajout du composé CV2640 au Paclitaxel permettait une amélioration significative de la chimiosensibilité dans nos cellules A549 résistantes. Nous avons également analysé les profils transcriptomiques des lignées A549 parentales et résistantes au paclitaxel par séquençage de l'ARN concluant à un transcriptome largement dérégulé. Par ailleurs, de nombreux gènes cibles de YAP/TEAD sont de fait significativement diminués dans nos cellules résistantes, en présence du composé CV2640. Enfin, nous avons utilisé le système de puce micro-fluidique 3D développé par l'équipe, pour étudier l'effet d'une combinaison de CV2640 et de paclitaxel sur la lignée cellulaire A549 et sur des cellules tumorales provenant d'une tumeur fraîche du cancer du poumon. Au final, nous avons apporté des arguments pour étayer l'hypothèse que cette association semble améliorer la réponse cytotoxique *in vitro* et *in vivo* et pourrait

constituer une voie de recherche pharmacologique à l'avenir pour prévenir ou corriger une chimiorésistance acquise au paclitaxel.



YAP/TEAD involvement in resistance to paclitaxel chemotherapy in lung cancer

**Brosseau S^{1,2,3}, Abreu P¹, Bouchez C¹, Charon L¹, Kieffer Y¹, Picant, V¹
Veith I¹, Camonis J¹, Descroix S⁴, Mehta-Grigoriou F¹, Parrini MC¹,
Zalcman G^{1,2,3*}**

1- U830 INSERM "Cancer, Heterogeneity, Instability, Plasticity", team "Stress-Art", Institut Curie Research Centre, 26 rue d'Ulm 75248 Cedex 05 Paris, France

2- Université Paris Cité, Medicine Faculty, 26 rue Henri Henri Huchard 75018 PARIS, France

3- Thoracic Oncology Department, Clinical Investigation Centre (CIC) 1425 INSERM, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), 46 rue Henri Huchard 75018 Paris, France

4- UMR 168 CNRS "Physics and Chemistry Curie" Institut Curie Research Centre, 26 rue d'Ulm 75248 Cedex 05 Paris, France

*** corresponding author:**

G. Zalcman

Thoracic Oncology Department, Clinical Investigation Centre (CIC) 1425 INSERM, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), 46 rue Henri Huchard 75018 Paris, France

Abstract

Background: The Yes-associated protein (YAP) oncoprotein has been linked to metastasis and resistance to chemotherapy. We aimed to investigate the effect of YAP pharmacological inhibition in chemo-resistant lung cancer cells.

Methods: YAP subcellular localization, cell migration, and TEAD-dependent transcriptional activity were investigated in cancer cell lines with up-regulated YAP, with and without YAP inhibitors. Parental (A549) and paclitaxel-resistant (A549R) cell transcriptomes were analyzed. The half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of paclitaxel or trametinib combined to YAP inhibitor CV2640 was determined. A three-dimensional (3D) microfluidic tumor-on chip model was used to study the effect of CV2640/paclitaxel combination on cancer cells isolated from fresh resected lung cancer samples.

Results: YAP activity was significantly higher in paclitaxel-resistant cell lines. YAP/TEAD inhibitor decreased YAP activity in A549, PC9 and H2052 cells, and reduced YAP nuclear staining. Wound healing assays upon YAP inhibition showed impaired cell motility of lung cancer A549 and mesothelioma H2052 cells. Combining YAP pharmacological inhibition with MEK inhibitor trametinib in A549, which are K-Ras mutated, recapitulated synthetic lethality sensitizing these cells to MEK inhibition. The YAP inhibitor CV2640 lowered paclitaxel IC₅₀ in A549R cells. Differential transcriptomic analysis of parental and A549R cells revealed an increase of YAP/TEAD transcriptomic signature in resistant cells, which was down-regulated upon YAP inhibition. YAP inhibitor was able to restore paclitaxel sensitivity to A549R cells cultured in a 3D microfluidic system, while lung cancer cells isolated from a fresh tumor were efficiently killed by YAP inhibitor/paclitaxel doublet.

Conclusions: New evidence on YAP/TEAD transcriptional program role in resistance to chemotherapy opens routes for therapeutic YAP targeting.

253 words

Keywords: lung cancer; YAP (yes-associated protein); TEAD; microfluidics; chemo-resistance; paclitaxel

Introduction

Nowadays, lung cancer remains the leading cause of cancer-related deaths worldwide with almost 1.8 millions of deaths per year (1). Remarkable efforts have been made worldwide to understand the molecular basis for such aggressiveness of lung cancer, especially non-small cell lung cancer (NSCLC), allowing the development of targeted therapies for cancers with oncogenic addiction, or immunotherapy for tumors devoid of addictive targetable mutations. However, chemotherapy remains the backbone treatment for NSCLC patients, either associated with immunotherapy for patients with not-addicted tumors, or in subsequent lines setting, for patients with tumors containing an oncogenic addictive mutation progressing upon frontline tyrosine kinase inhibitors. Despite recent advances, patients with metastatic NSCLC still have a dismal prognosis. Poor overall survival could be attributed, at least in part, to the development of drug resistance to systemic therapies. So far, only few genetic (selection of pre-existing genetic variants) and non-genetic (up-regulated expression of the therapeutic target, activation of compensatory pathways...) mechanisms have been identified, through which cancer cells develop drug resistance (2). Paclitaxel is a widely used anti-microtubules agent for treatment of lung cancer patients. Unfortunately, acquired resistance to such agent remains frequent, with patients ultimately showing disease progression and metastases emergence. The mechanisms of chemo-resistance have been extensively studied but biological mechanistic processes remain elusive (3–6).

Initially discovered in *Drosophila Melanogaster* for its role in development and control of organs size, Hippo signaling pathway has been conserved throughout evolution from drosophila to mammals, emphasizing its major role in tissue homeostasis (7). Once activated, core serine threonine kinases of this cascade, Mammalian Sterile 20-like kinase (MST) 1 (aka 'Hippo' in drosophila) and 2 and Large Tumor Suppressor (LATS) 1 and 2 ('Warts' in drosophila) lead to phosphorylation of their final downstream effectors, the paralogs Yes-associated protein (YAP) and Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ). Such serine phosphorylation inactivate YAP/TAZ which could then be sequestered in cytoplasm by interacting with the 14-3-3 chaperones, or targeted to proteasome degradation via ubiquitinylation (8). YAP/TAZ act as transcriptional co-regulators by interacting with DNA-binding transcription factors (mainly TEAD1-4 genes, *i.e.* TEA Domain Transcription Factors), to modulate the mRNA expression of genes involved in cell proliferation, survival, migration and stemness (9). YAP has been found to act as a powerful oncogene in several cancers, especially in NSCLC in which increased YAP was correlated

with poor prognosis (10). Upstream negative regulators of such pathway consist of tumor suppressor genes often inactivated by mutation (NF2/Merlin in mesothelioma), or promoter gene methylation (RASSF1A in NSCLC) (11), leading to YAP-mediated transcriptional activity up-regulation. Several studies have suggested that deregulation of the Hippo/YAP pathway could contribute to the acquirement of anti-cancer drug resistance in solid tumors (2,12). Recently, drugs that directly (such as Verteporin), or indirectly (such as statins), target Hippo signaling pathway have been tested to overcome drug resistance in cancer cells (13,14). Unfortunately, high doses were needed to reach relevant YAP inhibition, leading to predictable side effects limiting their clinical utility (13). More recently, inhibitors able to bind the interaction surface of TEAD with YAP, based on the three-dimensional structure of the two proteins complex, namely targeting the palmitate consensus cysteine, which is palmitoylated, have been rationally designed and synthesized, showing YAP/TEAD transcriptional inhibition ability, and inducing tumor regression in mice xenografted tumors, deriving from cells with up-regulated YAP signaling (with mutation of NF2, for instance). Such first-generation YAP/TEAD inhibitors were active at 10 μ M range or more, thus limiting their clinical applicability. However, a second-generation drug with 500 nM (IK-930, by Ikena Oncology™) is currently in development, in a first-in human phase I trial, just beginning. Other YAP inhibitors have been isolated from large interaction screens, by different companies, and still are in preclinical development. We were supplied such compounds by INVENTIVA™ Biotech Company, and were able to assess their biological efficacy in inhibiting YAP/TEAD activity, using several biological assays. Our aim was first to assess their efficacy in limiting NSCLC cells migration, since we previously reported RASSF1A inhibition could increase cancer cell migration by activating YAP (15). Then, we aimed to look whether such inhibitors could alter cancer cells sensitivity to the anti-tubulin paclitaxel agent, since we previously reported that RASSF1A depletion and YAP activation could impair cytokinesis a feature linked to deregulation of microtubules (16)

Since *in vitro* 2D cell culture have been challenged in its ability to faithfully recapitulate *in vivo* drug sensitivity, we previously reported the use of a micro-fluidic 3D cell culture experimental system, a tumor-on chip model, in which cells are grown embedded in a polymerized collagen matrix, aiming at reconstituting *in vitro*, either with cell lines, or with human cells directly isolated from fresh tumors, a more physiological culture system, prone to better recapitulate *ex-vivo* cytotoxic drugs cancer cell sensitivity (17–19). We therefore used this system for the first time, to our best knowledge, to assess YAP inhibitors activity on cell growth and apoptosis, alone or in combination with paclitaxel. Herein, we present *in vitro*

and *ex-vivo* studies assessing the effects of YAP/TEAD pharmacological inhibition on cell migration, YAP nuclear cellular localization, synthetic lethal activity in K-Ras mutated cells, and re-sensitization drug-resistant lung cancer cells to paclitaxel, using classical 2D cell cultures, along with a microfluidic 3D cell culture experimental device.

Materials & Methods

Cell lines and culture reagents. Parental lung adenocarcinoma cell lines A549 (CRL-185) and HCC827 (CRL-2868) were obtained from Kent University Resistant Cancer Cell Line (RCCL) collection, with their counterpart sub-clones A549R and HCC827R, resistant to paclitaxel after long-term cultures with 20 nM of paclitaxel. Mesothelioma sarcomatoid cell line H2052 with constitutive YAP activation (20), and Met5A SV40-immortalized, not tumorigenic human mesothelial epithelioid cell line, were obtained from ATCC (CRL-5915, and CRL-9444 respectively), and passaged for fewer than six months after their receipt. PC-9 (CRL-1520) and HCC4006 (CRL-2871) lung adenocarcinoma cell lines from ATCC both contained an EGFR mutation (exon 19 deletion). All cell lines were STR genotyped to check their identity as previously described (15). Cells were maintained RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 10mM L-Glutamine, and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen™).

Compounds. YAP-TEAD inhibitors, (IV1611979, IV1611570, IV1612112, IV1612347, IV1612705, IV1612640 shortly CV2640), were provided by Inventiva™ Pharmaceutical Company (Daix, France), isolated from a high throughput alpha-lisa TEAD screen aimed to identify chemical series able to disrupt YAP-TEAD protein-protein interaction (PPI), TEAD binding being confirmed by Surface Plasmon Resonance (SPR), localization on TEAD protein by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (21). Their structure is patented and will not be revealed in this paper. Trametinib was purchased from Sellekchem™ (Houston, TX, USA) and Paclitaxel from Fresenius Kabi™ (Bad Homburg, Germany). All drugs were diluted in DMSO.

Wound healing assay. Culture-Inserts (Ibidi™) were used to measure cell migration. Cell suspension at a density of 6×10^4 /mL (70 μ L volume) was plated in each well of the Culture-Inserts. After the appropriate duration for cell attachment (18 h), the cells were incubated at

37°C for 2 h in DMEM medium with 1 % fetal bovine serum (FBS). Then, cells were treated with YAP-TEAD interaction inhibitors (20 μ M). A cell-free gap of 500 μ m was created by the removal of the Culture-Insert. Images were captured every 15 minutes for 48 hours using an inverted phase-contrast automated video-microscope. The velocity of cell migration in three randomly chosen fields was calculated with AveMap freeware as previously described (22).

TGF β -induced epithelial to mesenchymal transition: Recombinant TGF β #240-B, R&D Systems™) was added in the culture medium at 2ng/ml concentration for 24 hours to induce epithelial to mesenchymal transition (EMT). For western-blot analysis, N-cadherin (cat#14215) and E-cadherin (cat# 94385) antibodies were from Cell Signaling Technology™ (Danvers MA, USA). YAP/TEAD inhibitors were used at 20 μ M concentration for 48 hours.

Immunofluorescence. Cells were plated on coverslips 24 hours before drug treatment at the concentration of 5×10^4 cells, to limit cell confluence. A549 and HCC827 cell lines were incubated with 10 μ M and 5 μ M CV2640 respectively, for 24 hours. Each well containing inhibitor compound was paired with a control well, containing DMSO. Cells were fixed and permeabilized as described (15). Slides were then incubated with primary antibody (rabbit Antibody, YAP cat#D8H1X, Cell Signaling, dilution 1:100), and secondary antibody (goat anti-rabbit Antibody, AlexaFluor488 InVitrogen™, dilution 1:1000), plus phalloïdine (InVitrogen™, dilution 1:500) for one hour in PBS buffer solution. Nuclei were counter-colored with Prolong (InVitrogen™) containing DAPI. Image J software was used for immunofluorescence quantification in the nucleus and cytoplasm of 150 cells per condition, and the ratios of nuclear to cytoplasm YAP then calculated.

IC50 experiments. A549 cell lines were seeded at 1,0000 cells density per well in 50ul culture medium, in 96 well culture plates. The following day, drugs were added at different concentrations in triplicates: 25 μ l of anti-YAP/TEAD compound at the final concentration of 10 μ M (stock concentration 10mM) and 25 μ l of paclitaxel-containing medium at varying concentrations (0.01nM, 0.1nM, 1nM, 10nM, 100nM, 1 μ g, 10 μ g, 100 μ g). After 3 days of drug treatment, cell viability was assessed using the Cell Titer-Glo 2.0 Cell Viability Assay™ (Promega™, Madison, WI, USA), according to the manufacturer's instructions. Using Grad Pad PRISM™ 9 software, the inhibitor IC50 was measured as the concentration that causes a

response halfway between the maximum response (top) and the maximum inhibited response (bottom).

Short interfering RNA (si RNA): Cells were transfected with 10nM siRNA in a petri dish plate. Control was non-targeting siRNA (SinT, AllStars negative control, cat#1027281) and the YAP1 silencing was obtained with YAP1 targeting siRNAs (YAP si1: 5'-TGA-GAA-CAA-TGA-CGA-CCA-A-3' and YAP si2; 5'-TTG-GTC-GTC-ATT-GTT-CTC-A-3'). Transfection reagent was lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA). 10,000 cells per well (96-well plate) were seeded, 24 hours after transfection. The IC50 was determined 3 days after drug addition.

Protein extraction and Western Blot

Protein Extraction: After addition of 120µl of IPLB lysis buffer containing Complete Protease Inhibitors, EDTA free (Roche Pharma™, Basel, CH), cells were collected, incubated 20 min on ice, then sonicated for 10 min and centrifugated for 10min at 13000 rpm and 4°C.

Western Blot: Cells proteins were heat denaturated for 5 minutes at 95°C, resolved in NuPAGE™ Novex 4-12% Bis-Tris midi protein gel (Invitrogen™) and electro-transferred onto a 0,45µm nitrocellulose membrane (Amersham Protran™ 0,45um, GE Healthcare Life Sciences™, Marlborough, MA, USA). The membrane was probed overnight at 4°C with YAP Rabbit monoclonal Ab (D8H1X) XP® (#14074, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). The following day, incubation with the secondary antibody was performed for 1 hour at room temperature, with detection of immunoreactive bands achieved using ECL 1.1 (Western Lightning Plus ECL™, PerkinElmer™, Waltham, MA, USA). Immunoblots were scanned with Chemidoc™ imaging system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), and protein bands analyzed using ImageJ™ software for protein quantification.

Dual Luciferase Assay: Cells (3×10^6) were transfected with a reporter plasmid containing the minimal promoter sequences of TEAD upstream of the gene encoding for firefly luciferase (firefly plasmid, 6µg, pGL3b 8xGTIIC TEAD) and with a normalizing plasmid containing a constitutive expression promoter (Renilla lpRL-TK plasmid, 0.02 µg, from Promega™, Madison, WI, USA) in Jet Prime Buffer and Reagent solution (Polyplus transfection™). Twenty-four hours after transfection, cells were washed (PBS 1X), detached (trypsin) and plated in 6-well plates at different concentrations (25×10^3 , 1×10^5 , 4×10^5 , 8×10^5 , 1.2×10^6).

10⁶) to obtain different levels of confluence. The YAP-TEAD interaction inhibitor CV2640 was added in the media, 4 hours minimum after plating, for 24 hours, at the dose of 10 µM for A549 cell line (n=10) and 5 µM for HCC827 cell line (n=7). Then cells were washed (PBS 1X) and lysed (Passive Lysis Buffer 1X, Promega™), 48 hours maximum after transfection in 96-well plates, and luminescence was quantified (Optima FLUOSTAR™) with a bioluminescence counter using two reagents (Luciferase Assay Reagent II and Stop&Glo Reagent, Promega™). The firefly/renilla luminescence ratio was measured for each cell line at different confluences.

RNA sequencing analysis: Parental and resistant A549 cells (3 x 10⁶) were seeded and grown up to 50% confluence. The YAP-TEAD interaction inhibitor CV2640 was added in the media for 24 hours. Cell lysis was performed with 750 µL of Qiazol™ and the lysis solution frozen at -80°C. The experiment was repeated three times, with two passages interval (n=3). Total RNA was extracted using miRNAeasy MiniKit (Qiagen™, Germantown, MD, USA) according to manufacturer's instructions. RNA concentration was assessed by a NanoDrop™ spectrophotometer. A minimum of 2 µg of RNA was required. RNA integrity and quality were analyzed using Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies™, Santa Clara, CA, USA). All samples with a RIN score > 7,5 were sent to the Institut Curie central lab facility for RNA sequencing. cDNA library was prepared using Nextera XT sample preparation kit followed by sequencing on NovaSeq (Illumina) paired-end 100. Reads were mapped on the human genome assembly GRCh38 (hg38) and quantified using STAR (version 2.6.1A). Only genes with on read in at least 5% of all samples were kept for further analyses. Normalization and differential analysis were conducted with DESeq2 R package. Principal Component Analysis was generated from variance stabilized normalized counts table on the 1000 most variables gens.

3D-culture on-chip

The experimental micro-fluidic system aiming at reconstituting *in vitro* with the lines, or *ex-vivo* from human cells directly isolated from fresh tumors, a 3D microenvironment on a chip, i.e. a "cancer-on-chip" system was previously described (18,23). The microfluidic chips (#DAX-1) were purchased from AIM-Biotech™ (Singapore, Singapore). Within the central chamber of the DAX-1 chip, cells from A549 cell line were seeded at a concentration of 2 x 10⁶ cells / mL in a matrix composed of type I rat tail collagen (Thermofisher Scientific™) at 2.3 mg/mL final concentration. Polymerization of the collagen solution was achieved by

incubation for 30 min at 37°C in a humidified chamber. Then, 120 µL of culture medium with different drug conditions (Paclitaxel, CV2640) were added in each lateral chamber. After the addition of the medium, the microfluidic devices transferred to the incubating chamber of the microscope for video-imaging (**FIGURE 8A**).

Before seeding in the gel, cancer cells were detached, and re-suspended at 1×10^6 cells/mL density in PBS with 5 µM CellTrace Yellow (Thermofisher Scientific™), for the detection of living cells in the red fluorescence channel. After incubation in cell medium for 5 min at 37°C, cells were centrifuged at 300g for 5 min, re-suspended in PBS and added to the rat-tail collagen solution. In order to visualize the cells undergoing apoptosis in the green fluorescence channel, CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Thermofisher Scientific™) was added to the media in the lateral chamber of the chip. Alternatively, to detect all-causes cell death we used DRAQ7 dye (Colorant DRAQ7™, Thermofisher Scientific™). The video-microscope was equipped with a CO₂ (5%) and temperature-controlled (37°C) incubator chamber, with saturating humidity ensured by humidified small sponges added in the chip surroundings. Time-lapse images were acquired with an inverted Leica DMi8™ equipped with a Retiga R6 camera™ and Lumencor SOLA SE 365™ light engine, using a 5X objective. The acquisition of images in transmission and fluorescent channels was performed every hour for a total duration of 72 h. STAMP software was developed and patented via MATLAB™ to count apoptotic events on the chip for 72 hours according to the "fluorescence switch" from red to green (23).

Cell isolation from fresh tumors

A digestion and negative selection method using MACS Tissue dissociation Kit, (Miltenyi Biotec™, San José, CA, USA) was used as previously described to recover the tumor cells from fresh surgical lung cancer samples (24). After tumor sample digestion with dissociation enzymatic buffer for 45 minutes at 37°, the tumor lysate was filtered and the erythrocytes removed using the Red Blood Cell lysis Solution 10X (Miltenyi Biotec™). Tumor cells were isolated with Tumor cells isolation kit, human Miltenyi Biotec™. Cancer cells were counted and their viability evaluated and a precise number of cells was re-suspended in a previously prepared collagen gel at 4°.

According the French regulatory rules, patients followed in the Thoracic Oncology Department of Hospital Bichat received an information leaflet, stating that anonymized clinical data would be collected, and that their cancer cells could be purified from fresh surgical pathological samples. They were reminded that they could oppose their data and cells

utilization for research purpose, at any time. The study was approved by the Institutional French Society of respiratory medicine (*Société de Pneumologie de Langue Française* (SPLF) review board (number #CEPRO 2020-051).

Statistical analyses

Immunofluorescence data were analyzed using GraphPad Prism™ version 9 software (Dotmatics™, San Diego, CA, USA). As they follow a normal distribution, the data were compared using the Student t-test. For IC50 data, which did not follow a normal distribution, comparisons used the Mann-Whitney test. Firefly/renilla luminescence ratios data did not either follow a normal distribution, and were compared using Wilcoxon test. For transcriptomics analyses, comparison of the YAP/TEAD signature between the different conditions was performed using a Welch two-sample t-test. For all statistical analyses, p-value < 0.05 was set for statistically significant difference.

Results

YAP-TEAD interaction inhibitors decrease YAP nuclear localization and cell velocity.

In order to study the biological effects of the different YAP/TEAD interaction inhibitors compounds supplied by INVENTIVA™, we performed immunofluorescence assays allowing us to calculate the ratio of intensity between YAP nucleus and cytoplasm staining. These tests were performed on A549, H2052 and Met5A cell lines, grown at low to moderate density, to avoid any mechano-transduction effect leading to YAP nucleus exit in case of high cell density (**Figure 1**). With all the tested compounds, this ratio was significantly lowered in the A549 and H2052 cells, two cell lines with previously reported to have increased basal YAP activity, because of STK11 mutation and RASSF1A methylation for the former (15,16), and NF2 and LATS2 mutation for the latter (20). The most striking effect was obtained after treatment with the compound IV1612640, shortly named CV2640 ($p < 0,0001$, $n=3$, Student t-test) (**Figure 1, upper and middle panel**). Conversely, CV2640 did not affect the YAP nucleus/cytoplasm ratio the Met5A cell line did not support any effect of CV2640 in such immortalized, not tumorigenic cells, without known alteration in the Hippo/YAP pathway (**Figure 1, lower panel**).

We then analyzed by wound healing assays the migration speed of A549 and H2052 cells in the presence of two YAP-TEAD interaction inhibitors IV1612705 and IV1612640 at increasing concentrations (**Figure 2**). These treatments did significantly decrease the 2D cell velocity in a dose-dependent manner. Representative images of the wound healing assay were taken at 0 and 48 hours after scraping (**Figure 2**) and the velocity ($\mu\text{m/h}$) was calculated using Avemap™ freely available software, developed by our team, which allows to determine cell velocity with an image correlation method that is independent of cell proliferation (22). The 20 μM dose seems to be the most efficient dose, as it leads to a significant decrease in cell migration ($p < 0,0001$, $n=3$, Student t-test), without any toxicity detected. Accordingly, all other Inventiva YAP-TEAD interaction inhibitors provided did reduce cell velocity of both cell lines at 20 μM (**Suppl. Figure 1**), although the effects were more pronounced in H2052 cells, possibly suggesting a higher YAP inhibition susceptibility in these cells as compared with A549 cells.

YAP-TEAD interaction inhibitors partly revert epithelial to mesenchymal (EMT) transition induces by TGF- β in A549 lung cancer cells.

We previously reported (15), as many other authors, that YAP signaling activation, for instance by RASSF1A depletion, could induce EMT in epithelial lung cancer cells. A549 cells are already engaged towards a partial EMT, as emphasized by a basal low expression of N-Cadherin (**Figure Suppl.2, panel A**), which could be stimulated by TGF β treatment as shown by the increase of N-cadherin expression, with concurrent decrease of E-cadherin (25). Upon YAP pharmacological inhibition with the two most active compounds at 20 μ M (IV1612705 and IV1612640), we were able to inhibit N-cadherin expression induced by TGF β treatment (**Figure Suppl.2, line 1 panel B**), while concurrently E-cadherin failed to increase, suggesting that YAP pharmacological inhibition only partly reverted EMT in this lung cancer cell model (**Figure Suppl. 2, panel C** for quantification of four independent experiments). Such results support an actual effect of our YAP inhibitors in disrupting YAP/TEAD interaction, with a partial reversibility of TGF β -induced EMT as a functional consequence.

Anti YAP/TEAD Compounds sensitize A549 cells to MEK inhibitor

Trevor Bivona's team identified YAP pathway activation as a novel mechanism of resistance to kinase inhibitors targeting RAF and MEK therapy, in case of B-RAF V600E or K-RAS activating mutation. Indeed, they have shown a synthetic lethality effect induced by RNA interference-mediated depletion of YAP, and simultaneous inhibition of MEK by trametinib, specifically in K-Ras or B-Raf mutated cell lines, while such effect was not observed in cells devoid of MAP-K signaling constitutive activation (26). We therefore aimed to recapitulate such effect with pharmacological compounds targeting YAP/TEAD interaction, when used in combination with trametinib, to support their specific effect on YAP downstream signaling, in the A549 cell line exhibiting a K-Ras G12S oncogenic mutation, and a clear predominant nuclear YAP staining. For this purpose, we calculated the trametinib IC₅₀ in our cancer cells, in the presence of the different Inventiva compounds over a period of 7 days (since shorter durations of 72 hours were too short to observe any effect, data not shown) (**Figure 3A**). We could recapitulate with pharmacological agents the synthetic lethality induced in such cells by YAP genetic depletion when combining trametinib with the CV2640 compound. Indeed, the trametinib IC₅₀ was significantly reduced by CV2640 at

20 μ M for 7 days ($p=0,0432$, Student t-test, $n=3$). The compounds by themselves, without trametinib, did not show any significant toxicity (**Figure 3B**). To validate our results, we calculated the trametinib IC₅₀ in the presence of YAP SiRNA for 3 days, before fading of the YAP transient knock-down (**Figure 3C**). Of note, down-regulation of YAP without trametinib did not decrease cell viability per se (**Figure 3D**). YAP knockdown was maximal over 90% at 3 days, as shown on **Figure 3E**. Trametinib pharmacological efficacy was verified in cell extracts by the decrease of the phospho-ERK band on the Western blot showed on **Figure 3F**. Actually, YAP knockdown enhanced the efficacy of trametinib on A549 cells ($p<0.05$, Student's t-test, $n=3$), as did the YAP pharmacological inhibitor (**Figure 3C**).

Chemo-resistance of paclitaxel-resistant lung cancer cell line correlates with an increase of YAP activity

In order to compare the basal activity of YAP in parental cell lines and their paclitaxel-resistant counterparts, we performed a functional transactivation luciferase reporter assay as described by the S. Piccolo's team (27). The protocol involves co-transfection of two plasmids: a reporter plasmid containing TEAD minimal promoter sequences upstream the gene encoding firefly luciferase (Firefly plasmid - pGL3b 8xGTIIC TEAD), and a plasmid constitutively expressing renilla luciferase (Renilla lpRL-TK plasmid), to normalize for variation of plasmids transfection efficiency and transfection-induced toxicity. Thus, the bioluminescence is expected to be proportional to the nuclear content of active YAP. We observed that YAP activity, as measured by this luciferase reporter assay, is clearly higher in resistant A549 and HCC827 cells than in their parental counterparts ($p=0,0082$ for A549 and $p=0,0014$ for HCC827; $n=10$ for each cell line; Student-t test) (**Figure 4A**).

In order to confirm such results, with another YAP activity assay, we performed YAP immunofluorescence to quantify and compare YAP localization between the different cell lines. To do so, we calculated the YAP nuclear to cytoplasmic labelling ratio in 150 arbitrarily chosen cells for each condition, ensuring the cell density was low to moderate and comparable. The nuclear to cytoplasm YAP fluorescent signal ratio appeared to be significantly higher in the resistant A549 cells ($p<0,0001$; $n= 150$ cells, manual cell quantification, Student-t test) as compared with A549 parental cells (**Figure 4B**). However, the main localization of YAP does not appear to be significantly different between parental and resistant HCCC827 cancer cells ($p=0,6$; $n=150$ cells; paired t-test) (**Figure 4B**).

YAP/TEAD transcription activity is inhibited by CV2640

In order to characterize the effect of the CV2640 compound, we performed luciferase reporter assays and analyzed YAP nuclear immunofluorescence staining in the presence or absence of the compound. YAP activity, as measured by the luciferase reporter assay, was significantly decreased in the presence of CV2640 in A549 cells ($p=0,0156$ for parental and resistant A549 cell line, $n=7$; Wilcoxon test) (**Figure 5A**). Conversely, despite a clear trend as shown by the graph (**Figure 5A**), YAP activity was not significantly inhibited by the presence of the compound in HCC827 cells ($p=0,1250$ for parental HCC827 and $p=0,3125$ for resistant HCC827; $n=7$, Wilcoxon test), as it was in cells exhibiting molecular alterations in Hippo pathway genes, which show exquisite sensitivity to YAP inhibition, possibly related to the level of YAP activation (28). The dose of CV2640 used was $10\mu\text{M}$ in A549 cells and $3\mu\text{M}$ in HCC827, since $10\mu\text{M}$ was shown to be excessively toxic in the latter (data not shown) but which could also explain why the effects were weaker in HCC827 cells than in A549 cell line.

YAP localization was studied in parallel in the presence or absence of the YAP/TEAD interaction inhibitor compound, CV2640, in 3 independent immunofluorescence experiments with a total of 150 nucleocytoplasmic ratio measurements in each A549 and HCC827 cell sub-clones. A significant decrease in nuclear localization of YAP was well observed, for cells treated with the inhibitor compound, 24 hours prior to labeling, in parental as in resistant cells as compared with untreated cells not ($p<0.0001$ for A549 cells; $p=0.002$ for parental HCC827 cells and $p=0,0007$ for resistant HCC827 cells, student t test) (**Figure 5B**).

The YAP activity was then further measured by luciferase assay on three other cell types (**Figure 5C**). PC-9 and H2052 lines were reported by other authors to have high YAP activity. In both cell types a significant decrease in the YAP activity was obtained in the presence of relatively lower doses of the CV2640 compound (For H2052 cell line: $p=0,0236$, CV2640 $3\mu\text{M}$, $n=5$, Student-t test and for PC9 cell line: $p=0,0156$; CV2640 $3\mu\text{M}$, $n=7$, Wilcoxon test). PC-9 cell line, with oncogenic EGFR mutation, was recently reported to exhibit YAP/TEAD signaling activation in link with a TP53 gain of function mutation, which leads to mevalonate pathway activation, inducing cytoskeleton rearrangements *via* Rho activation, and ultimately YAP nuclear translocation (28). H2052 exhibit two mutations in the Hippo pathway, leading to YAP nuclear accumulation and activation (20). Such effect of YAP pharmacological inhibition was not found in a third EGFR-mutated cell model the HCC4006 cell line ($p=0,1250$; CV2640 $1,5\mu\text{M}$, $n=4$, Wilcoxon test (**Figure 5C**)).

YAP/TEAD transcription transcriptional signatures in parental and paclitaxel-resistant cells

We performed differential transcriptomic analysis between the parental and resistant A549 cells and found that resistant cells show an overexpression of YAP/TEAD target mRNAs as compared to the parental cell line (analysis using Metascape and EnrichR) (**Figure 6A**). Many similar pathways appear to be highly represented in both cell lines including cell cycle, MYC target, oxidative phosphorylation, and metabolism of RNA. We assessed the expression of YAP/TEAD target genes by constructing a 42-genes YAP/TEAD signature (**Figure 6B left**), based on our data mining from published literature, only selecting YAP/TEAD target genes as defined by CHIPseq by at least two different teams, and two different cell types (7,29,30). Such list comprised well-known targets, of which some are members of the Hippo pathway (AJUBA, FAT1, FRMD6, TEAD1/4, STK3/MST2, STK4/MST1 (Hippo), SCRIB, LATS2, WWTR1/TAZ, WWC1/Kibra), consisting in sorts of regulatory loops. Others are classical targets responsible for the pleiotropic effects of YAP/TEAD signaling such as AXL, AREG, CCND1, BIRC5/survivin. We then compared mean expression and mean z-score of individual genes and the whole signature in our two cell lines A549 and A549R, treated or not, with the YAP/TEAD inhibitor (**Figure 6B right**). GSEA analysis, based on the Broad Hallmark geneSet, confirms the significant down-regulation of these YAP/TEAD target genes in resistant A549 cells after treatment with the compound ($p=0,05$ mean expression; $p=0,037$ Z-score). Despite an objective trend in reduction of YAP/TEAD targets expression in parental cells, after treatment with the compound, the results were not significant ($p=0,7$ for mean expression; $p=0,5$ for Z-score), again suggesting that pharmacological YAP/TEAD inhibition has specifically robust effect on YAP/TEAD transcriptional program, only in cells with basal YAP high level of activation, such as the paclitaxel-resistant A549. Individual classical transcriptional YAP target genes such as CTGF and CYR61 were also up-regulated in resistant cells as compared with parental cells, with a decreased expression upon CV2640 in both resistant and parental A549 cells ($p\text{-value} < 0.05$) (**Figure 6C**).

CV2640 compound partly restores chemo-sensitivity to Paclitaxel

We then asked the question of whether inhibition of YAP/TEAD interaction impacts on sensitivity to paclitaxel. **Figure 7A** shows the IC₅₀ curves of Paclitaxel from the 4 independent experiments combined, showing that the pharmacological YAP/TEAD inhibitor CV2640 is capable to restore chemotherapy sensitivity in resistant cells (purple curve). For statistical analysis, we measured the areas under the curve (**Figure 7B**) demonstrating that the addition of CV2640 (10 μM) significantly reduces the area under the curve in resistant A549 cells ($p=0.02$; $n=4$; Mann Whitney test) and therefore increases the sensitivity of these cells to paclitaxel in standard 2D dishes. This difference is not observed in parental A549 cells, which are sensitive to paclitaxel (**Figure 7C**).

In order to demonstrate whether the anti-YAP compound from Inventiva could favor response to a cytotoxic agent (paclitaxel), we moved to a "tumor on chip" 3D micro-fluidic culture experimental system (**Figure 8**). We chose to start with the A549 cancer cell line model which is at least partially YAP-activated, as shown by our transcriptomic data. We therefore incubated A549 cells embedded in collagen with a medium containing different drugs at different concentrations, as well as a green apoptosis reporter (Cell Event Caspase 3/7). The microfluidic chips were then imaged under the microscope for 72h. We used STAMP software to quantify apoptosis events over time (24). Parental and resistant A549 cells were therefore treated either with 100 nM paclitaxel alone, the CV2640 compound alone at 20 μM, or with the combination of 100 nM paclitaxel and 20 μM CV2640. DMSO only was the control condition for A549 cells. 20 nM paclitaxel was the control for paclitaxel-resistant A549R cells, since these cells are routinely grown in presence of low-dose 20 nM paclitaxel.

For parental cells, in presence of C2640 and paclitaxel combination, cell death was slightly higher than the control ($p=0.04$, 2way Anova, $n=3$) (**Figure 8B left**). For resistant A549 cells, the C2640 and paclitaxel significantly and substantially increased cell death compared to both the control conditions ($p=0.02$, 2way Anova, $n=3$) and the 100 nM paclitaxel single-therapy ($p=0,04$, 2-way Anova, $n=3$) (**Figure 8B right**), indicating that under 3D chip culture conditions, inhibition of YAP by the CV2640 compound at least partly restored paclitaxel chemo-sensitivity in resistant cells, supporting a role for the YAP-TEAD pathway in paclitaxel resistance of A549 lung cancer cells.

We also studied the effect of the CV2640 compound in combination with paclitaxel in cancer cells from fresh tumors from patients with lung cancer operated at Bichat Hospital.

Here we give the example of a 70-year-old smoker who underwent right upper lobectomy for PDL10% lung adenocarcinoma, without molecular addictive alteration. For this experiment, we used DRAQ7 as a fluorescence general death-induced marker to monitor cell death of all-cause. We performed a manual count of dying cells as a function of time. The **Figure 8C** shows the cell death rate per 10 hours (left panel) and the cumulative cell death rate (right panel) over 48 hours. The anti-YAP compound alone was not toxic at 5 and 10 μ M in this experiment (red and magenta curves), while the addition of paclitaxel alone (200 nM, green curve) leads to cell death, as expected. The combination of with 10 μ M but not with 5 μ M CV2640, appears to increase cancer cell death as compared to paclitaxel alone condition. These preliminary results indicate that patient-derived tumor-on chips consist of an efficient strategy to investigate chemotherapy combinations with YAP inhibitors and to address the complexity of patient response heterogeneity.

2397 words

Discussion

By using pharmacological YAP/TEAD interaction inhibitors we aimed to provide new clues on the involvement of YAP signaling in acquired resistance to paclitaxel in lung cancer cells, and the interest of targeting and blocking the Hippo/YAP signaling pathway, to restore chemo-sensitivity or prevent acquired resistance in lung cancer patients, who receive paclitaxel in combination with carboplatin, and often with anti-PD-1 monoclonal antibody.

We were provided by InventivaTM pharmaceutical company a series of compounds isolated in a high throughput screen for drugs able to disrupt the interaction of YAP with its main target, the TEAD transcription factor. While the chemical structure of such compounds remains confidential, we first provide data showing that, actually, these drugs could act by inhibiting YAP signaling, since inhibiting biological properties attributed to TEAD transcriptional program: *i*) they were able to inhibit 2D migration of lung A549 and mesothelioma H2052 cancer cells, with activated YAP due to their genetic background, but without altering cell survival at dose of 20 μ M. Such effect is fully reminiscent with what we previously described by knockdown RASSF1A gene in bronchial cells, which up-regulates YAP (15) *ii*) these compounds were also able to induce YAP nuclear exit in these YAP-activated cells, while their efficacy was lower in immortalized not tumorigenic mesothelial

cells MET5A, devoid of basal YAP activation. *iii*) with such YAP pharmacological inhibition using the two most promising compounds on these two first assays (*i.e.* cell migration and YAP nucleocytoplasmic shuttling), we were also able to recapitulate the synthetic lethality induced by combining trametinib MEK inhibition with the YAP inhibitor, in K-RAS, MAP-K activated A549 cell line, as did T. Bivona's group who used RNA interference to deplete YAP (26). *iv*) taking advantage of the involvement of YAP signaling in EMT promotion, we finally showed that the C2640 drug was able to partly revert the EMT induced by TGF β in A549 lung cancer cells. Collectively, our data then supported that the compounds of this chemical series, isolated by Inventiva did have anti-YAP effects, since they were able to inhibit four well-known consequences of YAP activation in lung cancer (15,20,26).

We then addressed the issue of YAP contribution to paclitaxel resistance by using two couples of lung cancer cell lines, the A549 and HCC8277 parental cells, and their counterpart with acquired resistance to paclitaxel upon long-term culture with sub-lethal doses of paclitaxel. While the HCC827 couple did not show significant nuclear staining differences between sensitive and resistant cells, we actually found a much higher nuclear YAP content in A549R cells, of which "YAP-activated" status is well established in Literature while HCC827 (15,26), despite having an EGFR oncogenic mutation have never been described as a "YAP-activated" cell model to date. Using a transactivation assay luciferase reporter assay (27) we then showed that the YAP inhibitor CV2640 could significantly lower TEAD transcriptional activity, then demonstrating the direct effect of such compound on TEAD activity, much probably by disrupting YAP interaction with TEAD. A further step we showed the ability of this YAP pharmacological inhibitor to lower nuclear YAP nuclear-cytoplasmic shuttling, in both paclitaxel-sensitive and paclitaxel-resistant cells, while TEAD transcriptional activity, as measured by luciferase assay was only altered in cells with activated YAP, lung cancer A549 parental and paclitaxel-resistant, PC-9 and mesothelioma H2052. To support the activation of YAP/TEAD transcriptional activity in A549 model, we performed whole-exome RNAseq of both cells lines and showed the enrichment of a YAP 42-genes signature, in both A549 and A549R sub-clones, while in the latter being further increased as compared with parental cells. Furthermore, by treating these cells with CV2640 YAP/TEAD inhibitor we nicely showed that the whole YAP/TEAD signature was down-regulated, as well as individual classical YAP targets (CYR61, CTGF). Finally, by treating these two sub-clones, with paclitaxel alone or with the C2640 plus paclitaxel combination, we confirmed there were actually 2 logs of difference in paclitaxel IC50 values between the sensitive and the resistant sub-clones, and more importantly we were able to show a significant

decrease of paclitaxel IC50 value for the A549R paclitaxel resistant cells, supporting that YAP/TEAD inhibition could, at least, partly revert paclitaxel resistance in A549 lung cancer cells.

Such data should be put in perspective with the reported role of YAP/TAZ in the acquired resistance to RAF or EGFR inhibitors (20,21,31). For instance, anti-BRAF treatments have been reported to induce actin cytoskeleton remodeling, promoting YAP activation in BRAF-mutated melanoma cells (20,21). However, our comparative transcriptomic analyses between parental and resistant A549 cells also shows that the transcriptome is massively deregulated in resistant cells, and that many other signaling pathways differentiate these two cell sub-clones, beyond YAP/TEAD. Thus, the observation that YAP inhibition could only partly revert chemo-resistance might suggest that several mechanisms yet to be uncovered, could also contribute to such chemo-resistance.

In particular, the possible participation of Notch, Hedgehog and Wntless-type protein (Wnt) pathways, widely described in the literature for their contribution to chemo-resistance should be mentioned (32,33), especially because Notch2 was recently revealed as a *bona fide* YAP/TEAD transcriptional target in small-cell cancer cells (34). YAP was actually shown to drive chemo-resistance in such cells, also inducing the emergence of a non-neuroendocrine phenotype. Of note, our transcriptomic analysis of A549R cells also found an enrichment of the genes belonging to Notch and Wnt pathways, whether such results were the consequence of YAP activation or not.

One important asset of our work is the use of 3D microfluidic cell culture chip. Major inconsistencies between drug sensitivity as determined on 2D cell culture, with clinical correlates have been claimed. However, PDX need weeks to be established a time exceeding the clinical needs. Moreover PDX are not adapted to immunotherapy since using immune-deficient mice (35). More recently, spheroids and cell culture 3D on-chip systems, have emerged, both recapitulating 3D cell cultures conditions, giving more consistent results, better correlated with clinical observations, and exploitable results within a short time interval, compatible with clinical needs. Microfluidic systems, allow for low quantities of cells (1,000), and by using cell death fluorescent markers, also allow semi-automated cell death quantification upon drug treatments (23). They could finally help to reconstitute a more physiological, still imperfect, tumor microenvironment, by co-culturing cancer-associated fibroblasts (18), autologous immune cells (24,33–35). We used a rather simple microfluidic chip to reproduce the cumulative effect of YAP pharmacological inhibitor added to paclitaxel in sensitive and resistant lung cancer A549 cell lines. Moreover, we aim to develop such

systems to get a rapid answers on the efficacy of drugs, in individual patients, for guiding their treatment choice, including immune checkpoint inhibitors, since the system could be fully immune-competent with autologous T-cells purified from the same tumor (23,36). Accordingly, as a proof of concept, we were able to generate such a cell culture system from a patient who had lung cancer surgical resection, and succeeded to assess the efficacy of CV2640/paclitaxel combination, showing a promising cytotoxic effect as compared with paclitaxel alone. Further experiments with cells from several additional patients are on-going, using chemotherapy as immune checkpoint inhibition (*Veith I et al.* manuscript in preparation). Since YAP/TEAD transcriptional program contains multiple genes involved in immune response to cancer leading to immune cells recruitment and activation (CXCL5, CXCL2, SMAD2/3, CYR61, IL2, IL12A, IL1B, JAK2...), immune-suppressive CAF recruitment (CTGF, DPP4, GAS6, AXL), and or T-cell exhaustion (PD-L1, CTLA-4) (7,29,30), it will be interesting to evaluate pharmacological inhibition or YAP/TEAD as a strategy to potentiate the effects of immune checkpoint inhibitors treatment, possibly with the use of our lung cancer on chip microfluidic device, which can integrate immune cells (18).

1252 words

Acknowledgements

This work was funded by the National Agency for Research grant #ANR 2017 'Hippocure' (G. Zalcman, Inventiva™ company), the ARC Foundation for cancer research grant #PGA RF20180206991 (MC Parrini), and ITMO INSERM grant '3R', #19CR046-00 (MC Parrini & S. Descroix).

References

1. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2022 Oct 5]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
2. Nguyen CDK, Yi C. YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Trends Cancer*. 2019 May;5(5):283–96.
3. Volk-Draper L, Hall K, Griggs C, Rajput S, Kohio P, DeNardo D, et al. Paclitaxel therapy promotes breast cancer metastasis in a TLR4-dependent manner. *Cancer Res*. 2014 Oct 1;74(19):5421–34.
4. Han ZX, Wang HM, Jiang G, Du XP, Gao XY, Pei DS. Overcoming paclitaxel resistance in lung cancer cells via dual inhibition of stathmin and Bcl-2. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013 Jun;28(5):398–405.
5. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7280–95.
6. Monzó M, Rosell R, Sánchez JJ, Lee JS, O’Brate A, González-Larriba JL, et al. Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Jun;17(6):1786–93.
7. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev*. 2010 May;24(9):862–74.
8. Avruch J, Zhou D, Fitamant J, Bardeesy N, Mou F, Barrufet LR. Protein kinases of the Hippo pathway: regulation and substrates. *Semin Cell Dev Biol*. 2012 Sep;23(7):770–84.
9. Battilana G, Zanconato F, Piccolo S. Mechanisms of YAP/TAZ transcriptional control. *Cell Stress*. 2021 Nov;5(11):167–72.
10. Wang Y, Dong Q, Zhang Q, Li Z, Wang E, Qiu X. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*. 2010 May;101(5):1279–85.
11. de Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, et al. An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 May 15;18(10):2976–86.
12. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell*. 2016 Jun 13;29(6):783–803.
13. Tang Z, Ma Q, Wang L, Liu C, Gao H, Yang Z, et al. A brief review: some compounds targeting YAP against malignancies. *Future Oncol Lond Engl*. 2019 May;15(13):1535–43.
14. Sebio A, Lenz HJ. Molecular Pathways: Hippo Signaling, a Critical Tumor Suppressor. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015 Nov 15;21(22):5002–7.

15. Dubois F, Keller M, Calvayrac O, Soncin F, Hoa L, Hergovich A, et al. RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. *Cancer Res.* 2016 Mar 15;76(6):1627–40.
16. Keller M, Dubois F, Teulier S, Martin APJ, Levallet J, Maille E, et al. NDR2 kinase contributes to cell invasion and cytokinesis defects induced by the inactivation of RASSF1A tumor-suppressor gene in lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2019 Apr 12;38(1):158.
17. Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer.* 2019 Feb;19(2):65–81.
18. Nguyen M, De Ninno A, Mencattini A, Mermet-Meillon F, Fornabaio G, Evans SS, et al. Dissecting Effects of Anti-cancer Drugs and Cancer-Associated Fibroblasts by On-Chip Reconstitution of Immunocompetent Tumor Microenvironments. *Cell Rep.* 2018 Dec 26;25(13):3884–3893.e3.
19. Portillo-Lara R, Annabi N. Microengineered cancer-on-a-chip platforms to study the metastatic microenvironment. *Lab Chip.* 2016 Oct 18;16(21):4063–81.
20. Maille E, Brosseau S, Hanoux V, Creveuil C, Danel C, Bergot E, et al. MST1/Hippo promoter gene methylation predicts poor survival in patients with malignant pleural mesothelioma in the IFCT-GFPC-0701 MAPS Phase 3 trial. *Br J Cancer.* 2019 Feb 19;120(4):387–97.
21. Soude A, Barth M, Bocart S, Thoreau F, Mandry E, Contal S, et al. Abstract A129: Generation of YAP-TEAD Protein-Protein Interaction (PPI) inhibitors for the treatment of cancer. *Mol Cancer Ther.* 2015 Dec 1;14(12_Supplement_2):A129.
22. Deforet M, Parrini MC, Petitjean L, Biondini M, Buguin A, Camonis J, et al. Automated velocity mapping of migrating cell populations (AVeMap). *Nat Methods.* 2012 Nov;9(11):1081–3.
23. Veith I, Mencattini A, Picant V, Serra M, Leclerc M, Comes MC, et al. Apoptosis mapping in space and time of 3D tumor ecosystems reveals transmissibility of cytotoxic cancer death. *PLoS Comput Biol.* 2021 Mar;17(3):e1008870.
24. Corgnac S, Damei I, Gros G, Caidi A, Terry S, Chouaib S, et al. Cancer stem-like cells evade CD8+CD103+ tumor-resident memory T (TRM) lymphocytes by initiating an epithelial-to-mesenchymal transition program in a human lung tumor model. *J Immunother Cancer.* 2022 Apr 1;10(4):e004527.
25. Biondini M, Duclos G, Meyer-Schaller N, Silberzan P, Camonis J, Parrini MC. RalB regulates contractility-driven cancer dissemination upon TGF β stimulation via the RhoGEF GEF-H1. *Sci Rep.* 2015 Jul 8;5:11759.
26. Lin L, Sabnis AJ, Chan E, Olivas V, Cade L, Pazarentzos E, et al. The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat Genet.* 2015 Mar;47(3):250–6.

27. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 2011 Jun 8;474(7350):179–83.
28. Esposito D, Pant I, Shen Y, Qiao RF, Yang X, Bai Y, et al. ROCK1 mechano-signaling dependency of human malignancies driven by TEAD/YAP activation. *Nat Commun*. 2022 Feb 4;13(1):703.
29. Stein C, Bardet AF, Roma G, Bergling S, Clay I, Ruchti A, et al. YAP1 Exerts Its Transcriptional Control via TEAD-Mediated Activation of Enhancers. *PLoS Genet*. 2015 Aug;11(8):e1005465.
30. Zanconato F, Forcato M, Battilana G, Azzolin L, Quaranta E, Bodega B, et al. Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat Cell Biol*. 2015 Sep;17(9):1218–27.
31. Fan PD, Narzisi G, Jayaprakash AD, Venturini E, Robine N, Smibert P, et al. YES1 amplification is a mechanism of acquired resistance to EGFR inhibitors identified by transposon mutagenesis and clinical genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 26;115(26):E6030–8.
32. Stewart DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2010 Sep;75(3):173–234.
33. Stewart DJ. Wnt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2014 Jan;106(1):djt356.
34. Wu Q, Guo J, Liu Y, Zheng Q, Li X, Wu C, et al. YAP drives fate conversion and chemoresistance of small cell lung cancer. *Sci Adv*. 2021 Oct;7(40):eabg1850.
35. Decaudin D. Primary human tumor xenografted models ('tumorgrafts') for good management of patients with cancer. *Anticancer Drugs*. 2011 Oct;22(9):827–41.
36. Mencattini A, Lansche C, Veith I, Erbs P, Balloul JM, Quemeneur E, et al. Direct imaging and automatic analysis in tumor-on-chip reveal cooperative antitumoral activity of immune cells and oncolytic vaccinia virus. *Biosens Bioelectron*. 2022 Nov 1;215:114571.

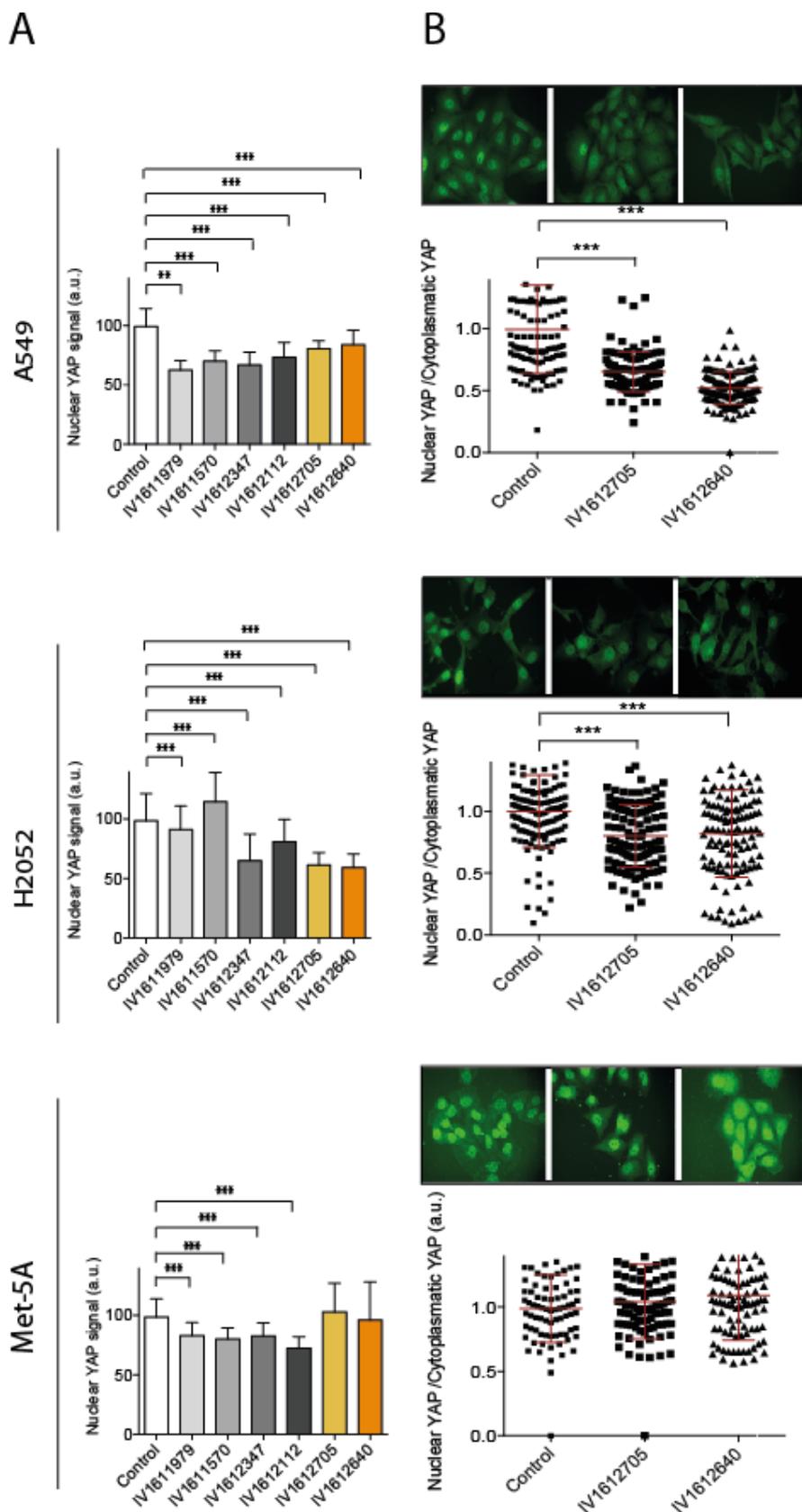


FIGURE 1 - YAP-TEAD interaction inhibitors decrease YAP nuclear localization in A549 and H2052 cells, but not in control Met-5A cells. A - Different YAP-TEAD interaction inhibitors induce nuclear YAP fluorescent signal decrease on lung cancer cell lines (A549, H2052 and Met-5A). N= 150 cells, automatic cell quantification. B - Ratio of quantification of nuclear and cytoplasmic YAP signal relative to YAP fluorescent signal from the images corresponding to each cell line. N= 150 cells, manual cell quantification. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 3 independent experiments (N=3). Student-t test is used for statistic. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ are calculated with respect to Control.

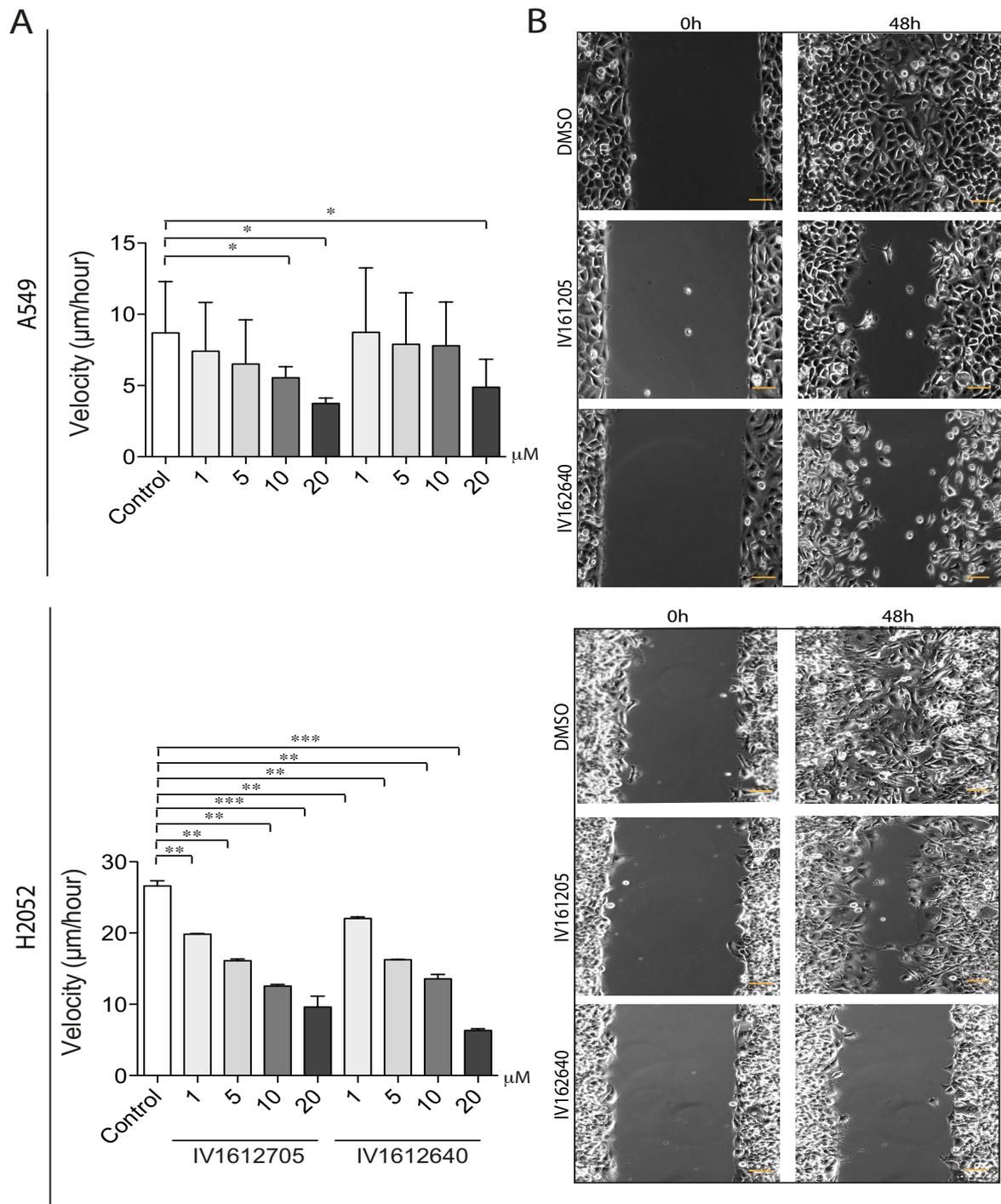


FIGURE 2 - YAP-TEAD interaction inhibitors decrease cell velocity.

A - AveMap velocity analysis of migration of A549 and H2052 monolayers showed that both IV1612705 and IV1612640 YAP-TEAD interaction inhibitors significantly decrease cell velocity in 2D at a mM concentration range.

B - Representative images of wound healing assay were taken at 0 and 48 hours after scratching. YAP-TEAD interaction inhibitors were used at 20 mM. Scale bar= 100 µm. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 3 replicates from 3 independent experiments (N=3). Student-t test is used for statistic. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ are calculated with respect to Control.

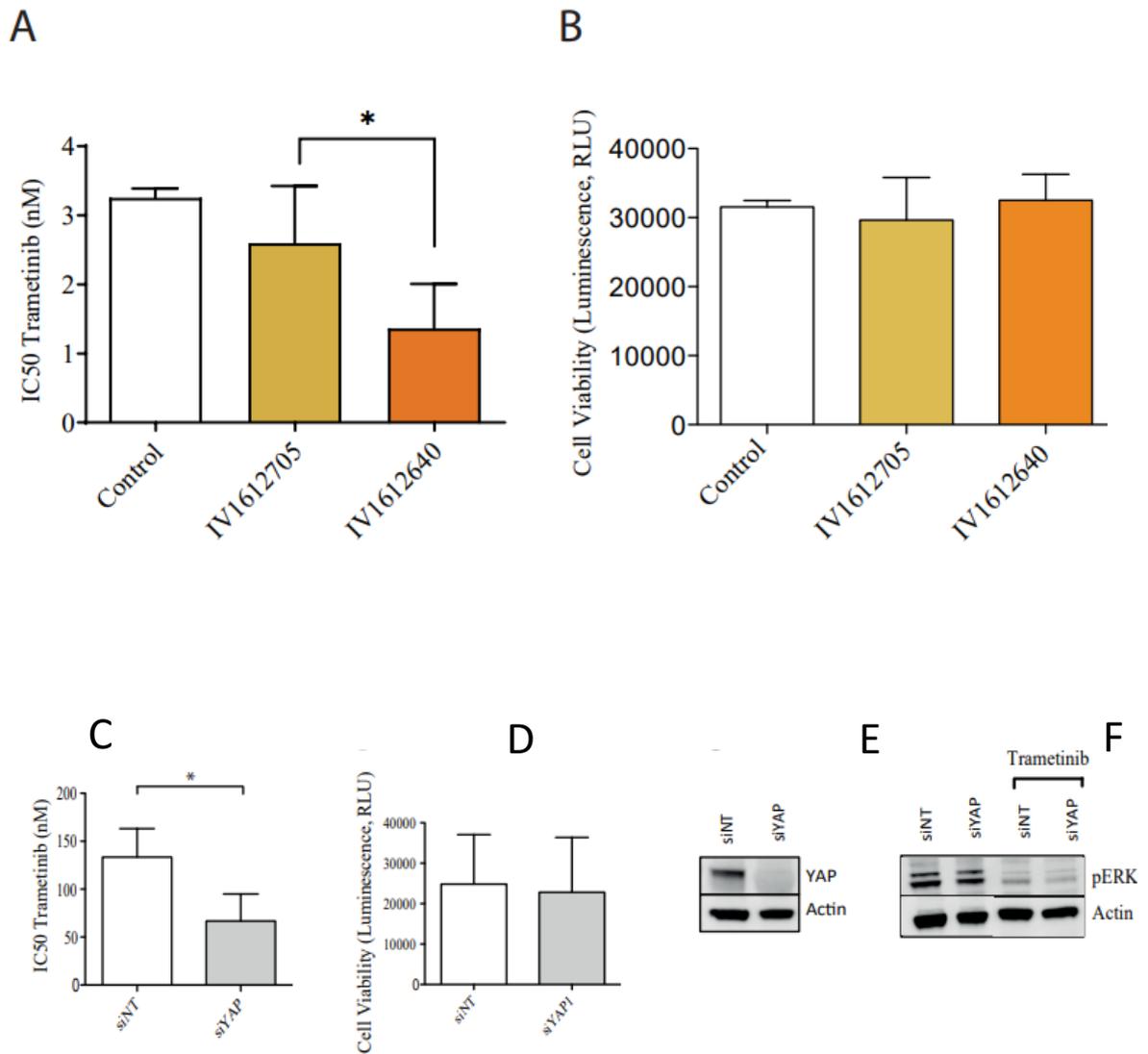


FIGURE 3 - Compounds sensitize A549 cells to MEK inhibitor

A - Different YAP-TEAD interaction inhibitors enhance the efficacy of trametinib on A549 cells. - At 5 mM, compounds did not decrease cell viability. B - The number of viable cells was determined 7 days after drug treatment using CellTiter-Glo luminescent cell viability reagent according to the manufacturer's protocol (Promega). Data are presented as the mean \pm standard deviation of 3 independent experiments (N=3). Student-t test is used for statistic. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ are calculated with respect to Control. C - siRNA against YAP enhance the efficacy of trametinib on A549 cells. D - YAP down-regulation did not decrease cell viability. The number of viable cells was determined 3 days after drug treatment using CellTiter-Glo luminescent cell viability reagent according to the manufacturer's protocol (Promega).

E - Western blot analysis of YAP protein level in A549 cells transfected with non-targeting or siRNA against YAP.

D - Western blot analysis of pERK protein level in A549 cells after 3 days of trametinib treatment. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 4 independent experiments (N=4). Student-t test is used for statistic. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ are calculated with respect to Control.

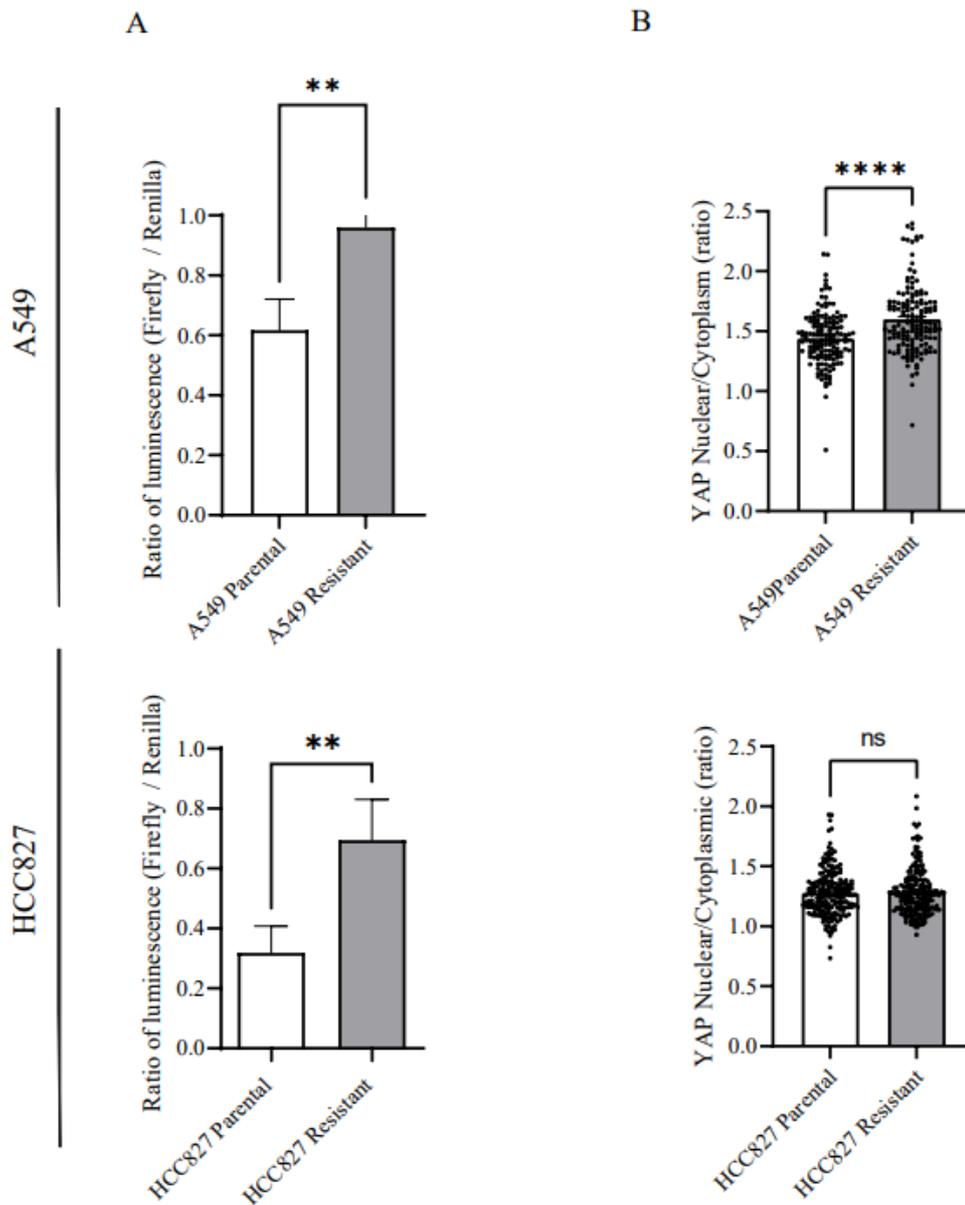


FIGURE 4 - YAP's activity is higher in resistant cells than in parental cells

A - YAP activity, as measured by a luciferase assay, is higher in the A549 and HCC827 resistant cells than in the parental cells. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 10 independent experiments for each cell lines (N=10). Student-t test is used for statistic. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 are calculated with respect to Control B - Ratio of quantification of nuclear and cytoplasmic YAP signal relative to YAP fluorescent signal from the images corresponding to each cell line. The nuclear/cytoplasmic ratio of YAP appears to be significantly higher in the resistant A549 cells. N= 150 cells, manual cell quantification. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 3 independent experiments (N=3). Student-t test is used for statistic. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 are calculated with respect to Control.

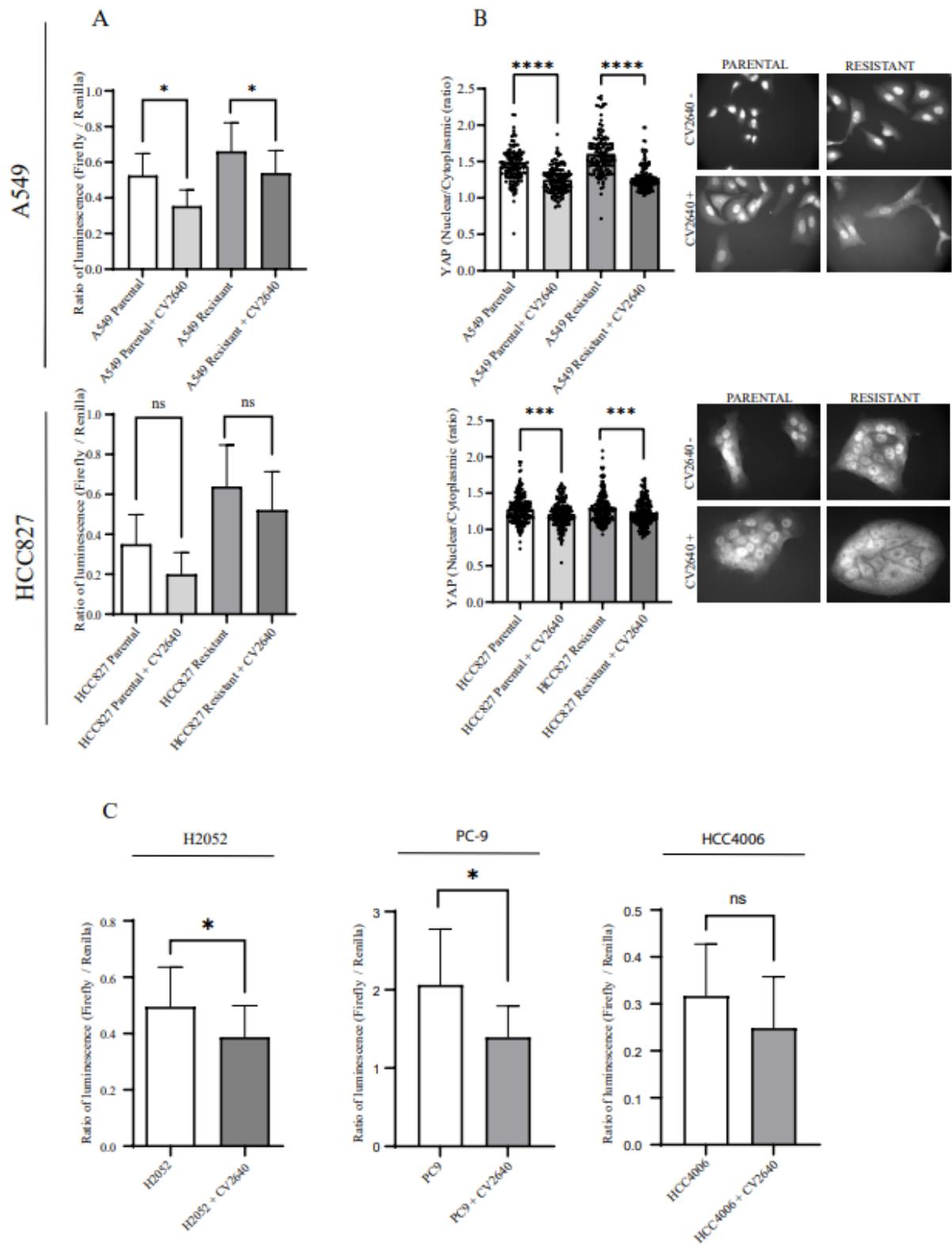


FIGURE 5 -YAP's activity is inhibited by CV2640

A - YAP activity, as measured by a luciferase assay, is significantly decreased in the presence of CV2640 in A549 cells (CV=10uM for A549; CV=5uM for HCC827). Data are presented as the mean \pm standard deviation of 7 independent experiments for each cell lines (N=7). Wilcoxon test is used for statistic. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 are calculated.

B - The ratio of nucleus to cytoplasm of YAP seems to decrease in resistant cells (n=150, Student-t test). N= 150 cells, manual cell quantification. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 3 independent experiments (N=3). Student-t test is used for statistic. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 are calculated with respect to Control.

C - YAP activity, as measured by a luciferase assay, is significantly decreased in the presence of CV2640 in H2052 and PC-9 cells. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 5 independent experiments for H2052 cell lines (N=5), of 7 experiments for PC9 (n=7), and 4 experiments for HCC4006 (n=4). The concentration of CV2640 was 3 μ l for H2052 and PC9 and 1.5 μ l for HCC4006. Student t-test (H2052) and Wilcoxon test (PC9 and HCC4006) was used for statistic. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001 are calculated.

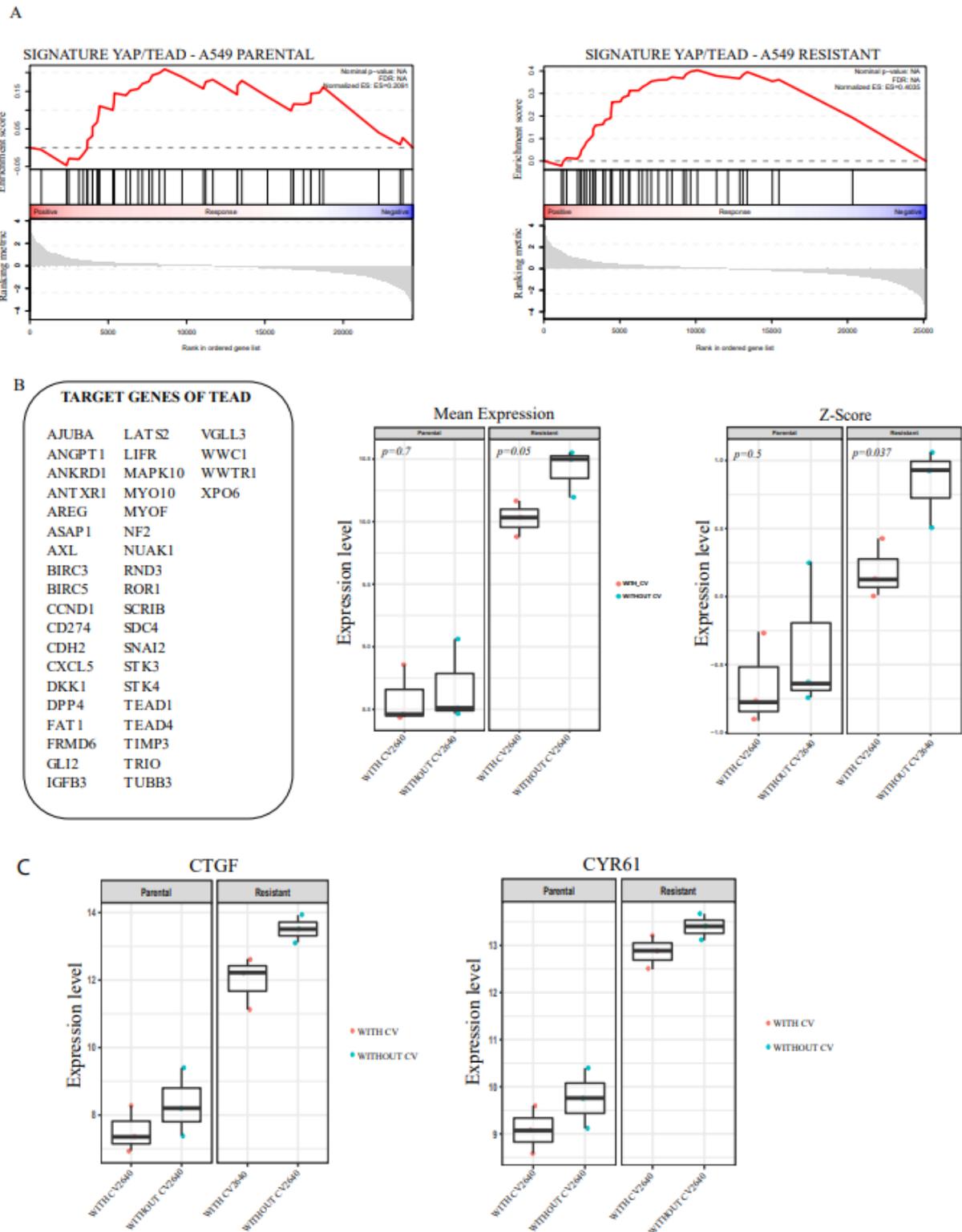


FIGURE 6 - Significant enrichment of TEAD signature in condition “without CV” in parental and resistant cells
 A – GSEA shows a significant enrichment of TEAD signature in condition “without CV” in parental and resistant cells. Differential analysis revealed a massively deregulated transcriptome between parental and resistant A549 cells. Data are presented as the mean expression and Z-score of 3 independent experiments (n=3).
 B - The compound CV2640 significantly decreases many YAP/TEAD target genes. The TEAD signature was homemade from published ChipSeq references (ref). Welch two-sample t-test is used for statistic.
 C - CV2640 significantly decreases gene expression of both CTGF and CYR61 in resistant A549 cells. Differential analysis performed using DESeq2 (adjusted p-value)

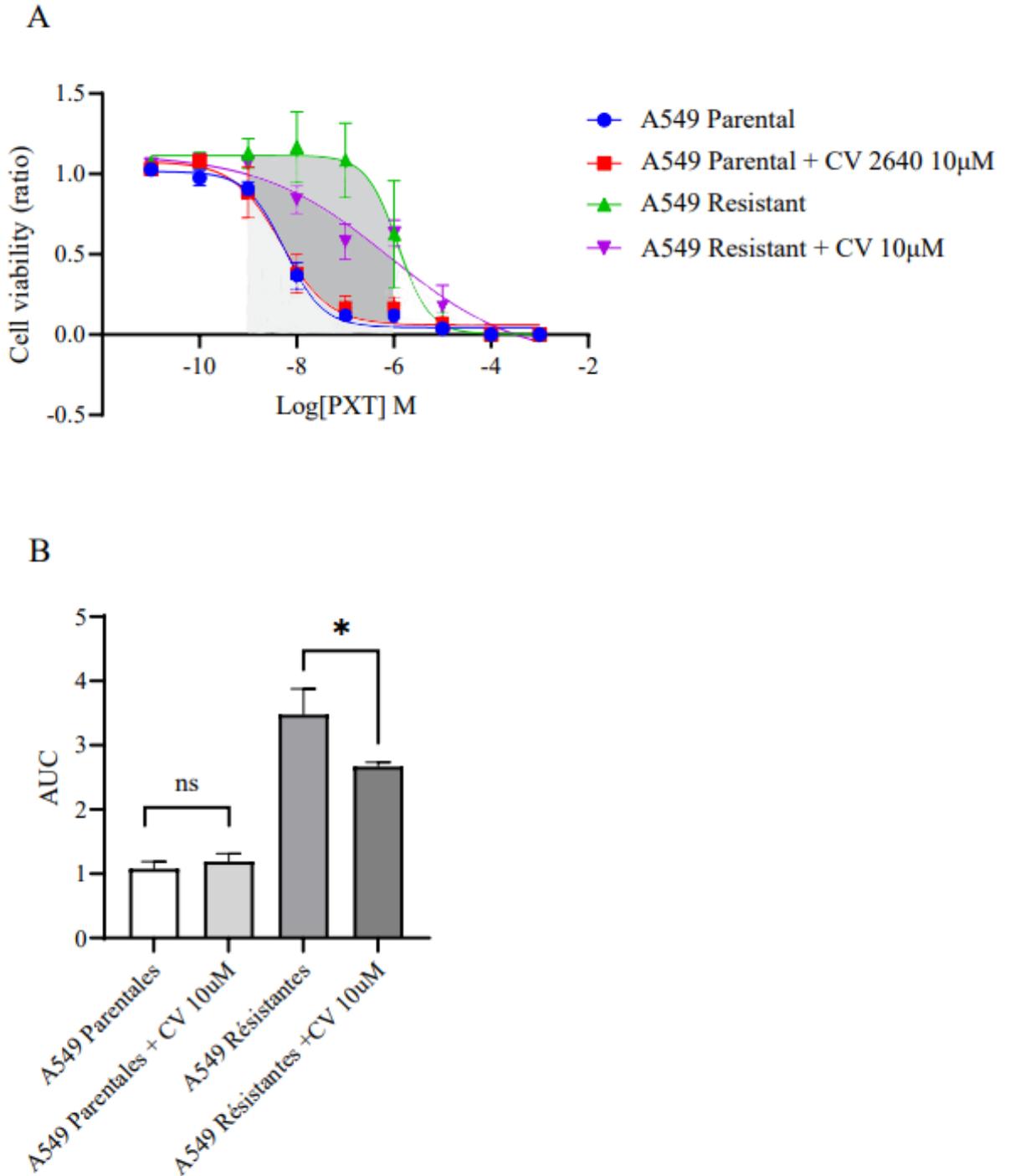


FIGURE 7 - CV2640 lift resistance to paclitaxel in A549 resistant cell line

A - The IC₅₀ of paclitaxel was calculated in resistant and parental A549 cell lines in the presence or absence of CV2640. Data are presented as the mean ± standard deviation of 4 independent experiments for each cell lines (N=4).

B- In order to compare the efficacy of the drugs, we calculated the areas under the curve (AUC) between the 10⁻⁵ and 10⁻⁹ concentrations of paclitaxel. Mann-Whitney test is used for statistic. *p < 0.05, ** p < 0.01, ***p < 0.001

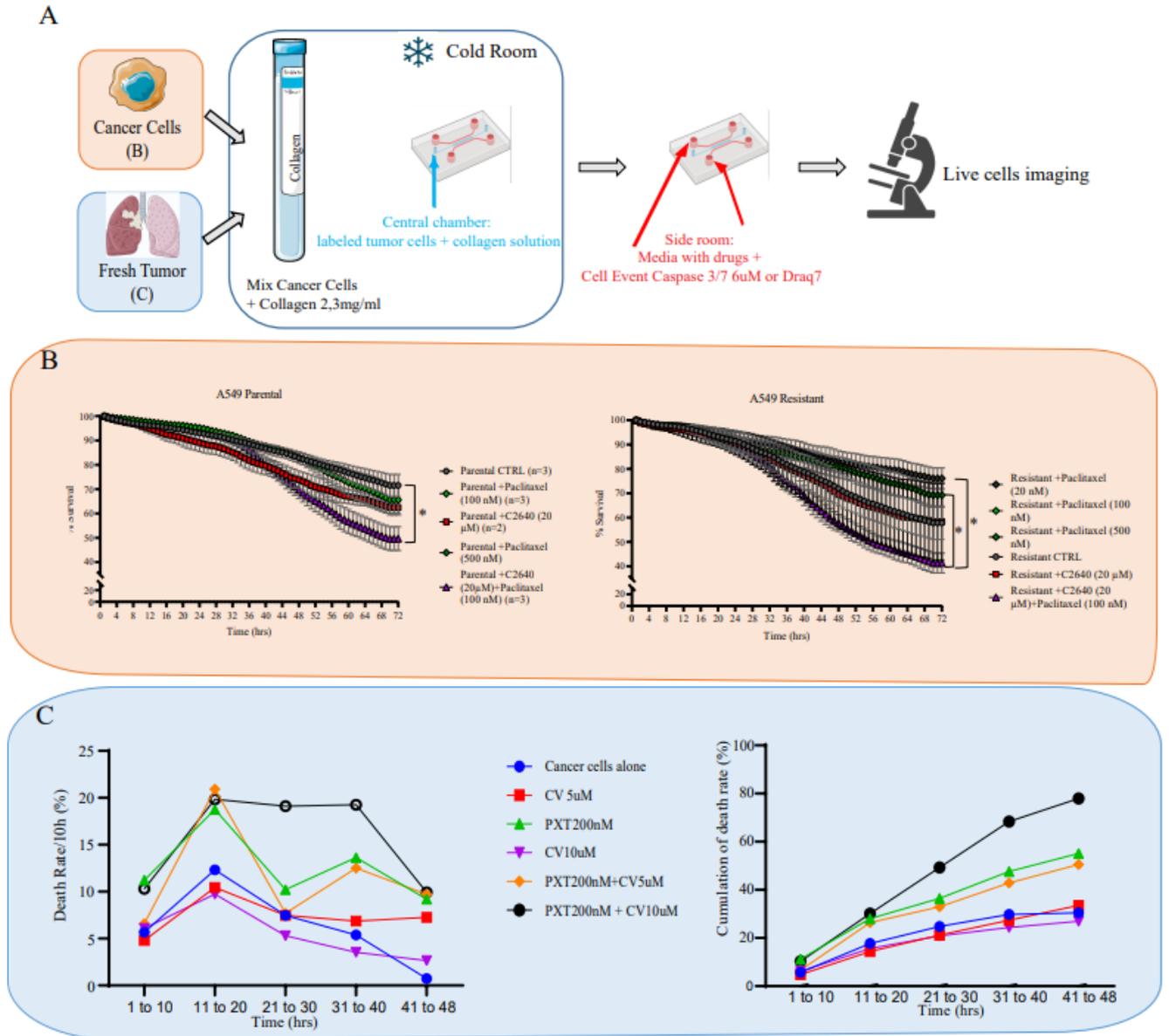


FIGURE 8 - CV2640 appears to reverse paclitaxel chemoresistance in 3D

A - Schematic representation of the "lung cancer on chip" method

B - STAMP method (Veith et al.): Cancer cells are located and tracked in the red channel. Cancer cells in death state (turning green due to caspase release) are identified in the green channel. The STAMP method allows to follow the death by apoptosis of cancer cells in time and space. The death signal will then disappear in time (t). Here is represented the cell survival rate in parental and resistant A549 cells (n=4). The combination of CV2640 with paclitaxel significantly resensitizes resistant A549 cells compared to the control condition.

C - Example of a "lung cancer on chip" with cancer cells from a fresh tumor of a patient who had a right upper lobectomy for a TTF1+ bronchial adenocarcinoma, without molecular alteration, PDL1 0%. Calculation of the ratio of dead cells / live cells per 10 hours (left figure) and the ratio of cumulative dead cells / number of live cells at to (right figure), in a single experiment (n=1). Manual count performed on 100 randomly selected live cancer cells and dead cells from all causes (green fluorescence of DraQ7 when cells die). The combination of CV2640 and 100nM paclitaxel seems to be effective with an increase of cell death in this patient. No statistics were performed.

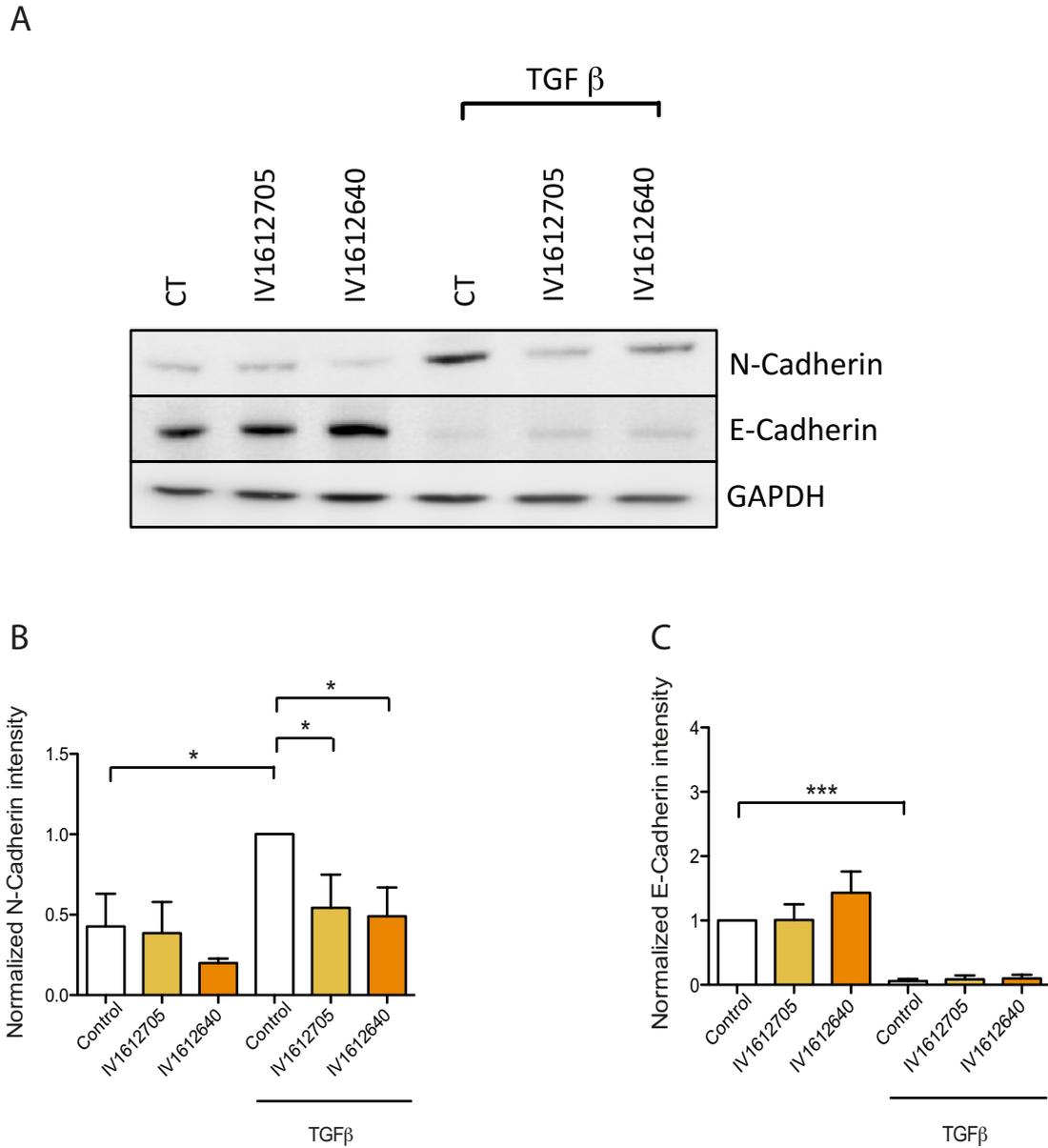


FIGURE SUPPLEMENTARY 1. YAP-TEAD interaction inhibitors affect the cadherin switch.

A – Western blot analysis of N-Cadherin and E-Cadherin during TGF β -mediated epithelial-mesenchymal transition. IV1612640 YAP-TEAD interaction inhibitors significantly decrease N-Cadherin induction in presence of TGF β at a 20 nM. B, C - Blots were quantified and normalized by Adaptin and GAPDH. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 4 independent experiments (N=4). Student-t test is used for statistic. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ are calculated with respect to Control TGF β (B) or to Control (C).

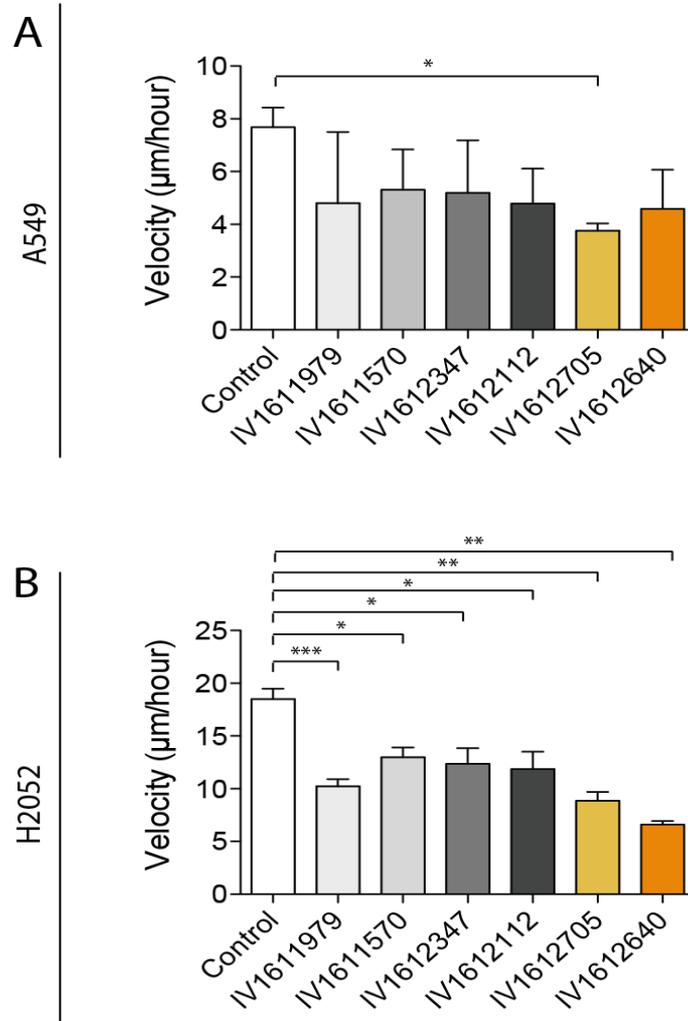


FIGURE SUPPLEMENTARY 2. YAP-TEAD interaction inhibitors decrease cell velocity. AveMap velocity analysis of migration of A549 (A) and H2052 (B) monolayers showed that different YAP-TEAD interaction inhibitors significantly decrease cell velocity in 2D at 20 mM after 48 hours of treatment. Data are presented as the mean \pm standard deviation of 3 replicates from 3 independent experiments (N=3). Student-t test is used for statistic. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ are calculated with respect to Control.

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours de ces trois années de thèse de sciences semblent apporter des éléments de réponse quant à l'implication de YAP dans l'acquisition de la résistance au paclitaxel et l'intérêt éventuel du blocage de la voie de signalisation Hippo/YAP, pour obtenir une restauration de la chimio-sensibilité au paclitaxel. Plusieurs éléments sont néanmoins sujets à discussion.

Tout d'abord, bien que la lignée cellulaire A549 parait être un modèle de choix dans l'étude de l'activité de la voie Hippo YAP, puisqu'ayant une mutation activatrice de G12S de K-RAS, une mutation de STK11/Lkb1 et une méthylation du promoteur de RASSF1A, avec comme conséquence, de base une activation de la voie YAP (1), l'activation de la voie YAP de la lignée HCC827, spéculée sur l'existence d'une mutation activatrice de l'EGFR devant entraîner une activation de la voie des MAP-Kinases passant par K-Ras et B-Raf n'est pas démontrée. *Dubois et al.* ont ainsi démontré que l'inactivation bi-allélique de RASSF1A présente dans la lignée cellulaire A549 entraînait de fait une augmentation significative de YAP (1). *Hsu et al.*, ont montré quant à eux que la surexpression forcée de YAP par transfection du plasmide YAP favorisait la résistance à l'erlotinib dans les cellules HCC827 (198). Dans les cellules HCC827 transfectées par le plasmide YAP, l'activité du rapporteur GTIIC et l'expression des gènes AREG et CTGF en aval de Hippo a augmenté de manière significative ($p < 0,05$), tout comme l'expression de l'ARNm ERBB3 ($p < 0,05$) suggérant que de vase, YAP est peu active. De fait, nos propres expériences montrent que le ratio de luminescence firefly / renilla après transfection du plasmide rapporteur dans lequel le gène firefly est placé sous le contrôle de séquences consensus TEAD, mesuré dans les cellules de la lignée HCC827 parentale, est nettement plus faible que celui mesuré dans les cellules de la lignée A549 parentale. Ce résultat pourrait donc expliquer la difficulté à démontrer un effet du composé inhibiteur CV2640 dans ce type cellulaire qui semble donc moins "dépendant" de la voie Hippo/YAP que ne le sont les A549.

Afin de valider nos expériences de Luciférase, nous avons réalisé ces expériences à des confluences différentes (de 5% à 100% de confluence) pour chaque type cellulaire puisque dans des cellules avec régulation physiologique de YAP, la confluence fait sortir YAP du noyau avec arrêt de la prolifération (inhibition de contact) (199). Ce contrôle nous a permis

de confirmer l'exactitude de nos tests. En effet, la corrélation observée de l'activité de YAP avec la confluence cellulaire est une des forces de nos expériences, montrant d'une part la fiabilité du test fonctionnel, et d'autre part que ces cellules bien que tumorales, sont encore sensible à une certaine inhibition de contact passant par YAP. Par contre, l'activité de YAP dans les cellules résistantes provenant de la lignée A549 semble moins sensible à la confluence, avec une baisse qui n'apparaît qu'à partir de 80% de confluence (alors qu'elle est observée dès 10% de confluence dans la lignée parentale). Néanmoins, nous ne retrouvons pas ces données dans la lignée HCC827, possiblement en raison d'une plus grande hétérogénéité des résultats expérimentaux obtenus.

Dans nos expériences, nous avons mis en évidence que la lignée A549 résistante, dérivée de la parentale après plusieurs mois de cultures à doses sub-létales de paclitaxel, avait une activité de YAP significativement plus élevée et une localisation nucléaire plus importante par rapport à sa contrepartie parentale. De façon intuitive, nous savons que l'activité de YAP est principalement corrélée à sa localisation nucléaire car l'action de ce co-régulateur est principalement nucléaire, alors que dans le cytoplasme il est majoritairement séquestré ou dégradé via le protéasome. Cette suractivité de YAP observée dans les lignées résistantes pourrait donc participer à l'acquisition d'une résistance à la chimiothérapie, bien qu'aucun lien mécanistique de causalité directe n'ait été mis en évidence dans nos expériences et que nous ne nous basons ici que sur une corrélation. Cette observation concorde cependant avec plusieurs études récentes publiées dans la littérature scientifique, suggérant le rôle possible de YAP dans l'acquisition d'une résistance à la chimiothérapie. *Song et al.* ont notamment démontré, *in vitro* que YAP pouvait être impliqué dans l'acquisition d'une résistance au cisplatine dans les lignées A549 (166) sans fournir d'explication précise sur ce rôle de YAP. Ils rapportent que l'invalidation de YAP par siARN permet une baisse de l'IC50 du Cisplatine et s'avère synergique à la chimiothérapie sur l'inhibition de la prolifération cellulaire.

De nombreux facteurs ont été impliqués comme mécanismes prédictifs de la résistance à la chimiothérapie. Cependant, ces données sont clairement variables en fonction du type de chimiothérapie, et du type histologique. Il est probable que la chimiorésistance soit multifactorielle avec de multiples facteurs intriqués les uns dans les autres. Plusieurs voies de signalisation ont déjà été décrites dans la littérature, comme actrices potentielles de ces mécanismes de résistance, comme les voies Shh (*Sonic Hedgehog*), Wnt (*Wingless Integration site*) et Notch (200–202). L'équipe de *Tian et al.* a notamment prouvé que l'inhibition de la voie Shh par le vismodegib inhibait de façon significative la prolifération tumorale des lignées cellulaires résistantes au cisplatine. L'inhibition de la voie Shh par

vismodegib et par siARN semblent sensibiliser les cellules avec mutation activatrice de l'EGFR au traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR(203). Dans nos expériences, l'analyse quantitative (degré d'expression des cibles transcriptionnelles) et qualitative (présence ou non de cibles transcriptionnelles vectrices potentielles de la résistance thérapeutique) des données transcriptomiques (signature YAP) dans les A549 parentales et résistantes permet nous de suggérer des pistes supplémentaires pouvant expliquer l'acquisition de résistance via l'activation de YAP dans ces types cellulaires et identifier, de fait, des potentiels gènes cibles. En effet, l'analyse transcriptomique a notamment permis de retrouver une régulation à la hausse de certains gènes traduisant l'activation des voies Wnt (ROR1 et DKK1) et Shh (GLI2), pouvant être impliqués dans la chimiorésistance, par l'acquisition d'un phénotype souche. Ces voies de signalisation semblent donc être étroitement liées à la voie YAP, et pourraient contribuer de façon synergique aux mécanismes de résistance. De fait, une corrélation entre l'activation de la voie Shh et l'expression des gènes codant pour les transporteurs ABC impliqués dans la chimiorésistance a déjà été décrite (204). De même, dans l'étude de *Dai et al.*, la perturbation de l'expression de YAP1 par un siRNA a atténué l'expression du transcrite ABCG2 et a réduit de manière significative la formation de sphères dans les cellules cancéreuses du poumon, propriété liée au phénotype "souche". La surexpression de YAP1 dans des lignées de cancéreuses pulmonaire a aussi conduit à une augmentation de l'expression d'ABCG2 (164). ~~Ces deux études nous mènent à dire que plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la résistance à la chimiothérapie et que leur description précise reste un enjeu majeur en oncologie thoracique.~~

Notre compréhension mécanistique de la chimiorésistance acquise reste parcellaire et même si nous apportons des éléments pour l'implication de la voie YAP/TEAD, il nous apparaît clairement que la poursuite de nos travaux sur l'implication de cette voie est nécessaire, afin d'identifier un éventuel moyen de contrecarrer cette contribution à la résistance secondaire.

Le composé CV2640, issu d'un screening chimique de composés pouvant interagir avec la poche d'interaction YAP/TEAD, dont la formule chimique est gardée confidentielle par le laboratoire Inventiva, semble entraîner une diminution de l'activité de YAP (mesurée par nos tests Luciférase), dans quatre lignées cellulaires différentes dites « YAP-dépendantes » : les lignées A549 parentales et résistantes, les PC9 et la lignée mésothéliale H2052. De la même manière, en immunofluorescence nous avons retrouvé une diminution du ratio nucléo-cytoplasmique de YAP dans les lignées A549 et HCC827 résistantes en présence du composé CV2640, soulignant ainsi la capacité de l'inhibiteur à induire une sortie de YAP

du noyau et/ou sa dégradation protéasomale, lorsqu'il ne peut interagir avec TEAD. Paula Abreu a aussi montré au laboratoire qu'on pouvait récapituler par voie pharmacologique le phénomène de létalité synthétique démontré initialement par ARN interférence de YAP dans des lignées avec activation de la cascade des MAP-kinases. Tous ces résultats confirment que le composé CV2640 induit bien une diminution biologiquement significative de l'activité transcriptionnelle de TEAD. A travers les expériences de culture en 3D sur puce, nous avons pu montrer que le composé CV2640 ne semble pas toxique per se, en monothérapie, mais qu'il présente au minimum un effet additif, voire synergique, en association avec la chimiothérapie dans la lignée A549 résistante. Il convient de noter que dans cette expérience en 3D, les cellules de la lignée A549 résistantes semblent mourir spontanément plus précocement (dans les 24 heures, plutôt que dans les 48 heures), que leur contrepartie parentale, sans qu'aucune explication à ce phénomène n'ait été identifiée, si ce n'est peut-être une plus forte létalité synthétique dans ces cellules, liées à une plus forte "dépendance" à YAP, ce qui reste purement hypothétique.

Nous avons réalisé les mêmes expériences dans la lignée HCC827, à la dose de 3 μ m. Les résultats obtenus dans les HCC827 résistantes n'ont pas été aussi concluants que dans les lignées A549 résistantes. Comme évoqué antérieurement, ces résultats pourraient être considérés comme logiques, compte tenu un niveau d'activation de YAP beaucoup plus faible dans ces cellules mutées EGF-R. Nous n'avons pas présenté les résultats obtenus dans les HCC827 sur puce pour plusieurs raisons. Premièrement, la quantification de la survie et de la mort cellulaire est extrêmement difficile dans ce type cellulaire, compte tenu leur caractéristiques de prolifération. En effet, ces cellules cancéreuses ont la spécificité de pousser en conglomérat d'amas cellulaires ce qui rend le comptage de cellules vivantes complexe voire impossible que ce soit manuellement ou via la technique semi-automatique STAMP. Deuxièmement, même si la quantification relevait du défi, le composé CV2640 ne semblait pas avoir d'effet additionnel net à celui de la chimiothérapie dans ce modèle cellulaire.

A l'inverse nous avons pu montrer que le composé CV2640 diminuait la résistance au paclitaxel des cellules A549R résistantes, sans toutefois restaurer une sensibilité totalement superposable à celle des cellules parentales. Ce résultat apporte donc certains arguments pour une implication de YAP dans cette résistance au paclitaxel. Pour autant, nous ne pouvons exclure l'insuffisance d'activité de notre inhibiteur CV2640, même si, en 2D, les résultats obtenus avec le composé Inventiva sont très superposables à ceux obtenus avec un autre inhibiteur validé dans la littérature, le TED-347. Une hypothèse alternative serait que les changements épigénétiques induits par l'activation de YAP sur la conformation de la

chromatine ne soient pas intégralement réversibles. Une autre hypothèse pourrait être liée à la cinétique de nos expériences possiblement trop courtes pour observer une totale réversibilité de par une demie-longue de certains ARN messagers dont l'expression est induite par l'activation YAP/TEAD. De fait, la genèse de clones résistants au taxanes nécessitent plusieurs semaines ou mois de cultures à concentration sub-létale de paclitaxel, et la réversibilité de cette chimiorésistance acquise pourrait nécessiter plus que 72 à 96 heures la durée habituelle de nos expériences. Nous n'avons pas testé la culture sur un long terme de nos cellules résistantes, en l'absence complète de taxol pour évaluer la réversibilité du phénomène de résistance, et surtout la cinétique avec laquelle on pourrait restaurer la chimio-sensibilité. De telles expériences ont été effectuées dans notre unité par l'équipe de Fatima Mechta-Grigoriou, sur des lignées de cancer de l'ovaire rendues résistance au taxol et au cisplatine, montrant que la réversibilité nécessitait plusieurs semaines, et n'était pas systématique pour tous les clones résistants, même si en l'occurrence le substratum de la résistance de ces lignées pourrait être différent de ce qui est observée dans les A549R. Si nous pouvons supputer que YAP est largement impliqué dans la résistance au paclitaxel mais que d'autres voies de signalisation sont probablement en cause. Nous pouvons notamment évoquer la possible participation des autres voies précédemment citées telles que Notch, Hedgehog et Wingless-type protein (Wnt) largement décrites dans la littérature(200,205) mais qui mériteraient d'être testées dans nos modèles cellulaires, même si n'était pas l'objet premier de ma thèse. Ces voies peuvent chacune jouer un rôle dans le maintien des populations de cellules souches cancéreuses et, à ce titre, jouer un rôle important dans la résistance à la chimiothérapie (205). L'analyse transcriptomique différentielle réalisée avec l'aide du bio-informaticien de l'équipe U830, le Dr. Yann Kieffer, nous a permis de conclure à un transcriptome largement dérégulé entre nos cellules A549 parentales et résistantes. Une analyse différentielle pour identifier les gènes dérégulés nous a permis d'identifier différents « pathways » enrichis dans nos lignées A549 (via les algorithmes EnrichR et Metascape) et une analyse GSEA a été réalisée en se basant sur le Broad Hallmark geneset. Toutes ces analyses nous ont amené à conclure que de fait il existait un nombre important de voies de signalisation dérégulées dans nos lignées résistantes par rapport à leur contrepartie parentale. De façon assez intéressante, les cascades de signalisation régulées à la hausse au plan transcriptionnel étaient assez similaires dans les cellules A549 parentales et résistantes, quand on compare la condition de culture « avec l'inhibiteur de YAP/TEAD CV2640 et la condition de culture « sans CV2640 ». Il est donc pertinent notamment de noter que les principales voies similaires entre les deux lignées cellulaires dans la condition « avec CV2640 » sont celles faisant intervenir le cycle cellulaire,

le métabolisme de l'ARN, la phosphorylation oxydative, et la voie MYC. Dans la condition « sans CV2640 », les principales voies retrouvées étaient la voie Wnt, la cascade mTOR, les enzymes du métabolisme lipidique et les enzymes lysosomiaux.

Afin de confirmer l'implication de la voie de signalisation Hippo/YAP dans la résistance au Paclitaxel, suggérée par l'effet de l'inhibiteur pharmacologique CV2640, nous avons initialement réalisé différentes expériences d'IC₅₀ du Paclitaxel dans des cellules A549 résistantes, après transfection des ARN interférents éteignant YAP. De façon décevante, les valeurs d'IC₅₀ mesurées 72h après la transfection de Si YAP dans des cellules A549 résistantes ne sont significativement différentes des valeurs observées avec un siARN irrelevant. L'efficacité de la transfection avait bien été validée par Western blot réalisé 72h après transfection. Nous avons donc ensuite postulé qu'une compensation de l'activité YAP pouvait se faire via son orthologue TAZ puisque G. Levallet et G. Zalzman avaient déjà observés une augmentation de l'expression de TAZ après invalidation de YAP dans des cellules épithéliales bronchiques, le même phénomène ayant aussi été observé par un autre groupe de notre Unité, travaillant sur des lignées de neuroblastome de sous-type mésenchymateux avec forte expression basale de YAP (Dr. Isabelle Janoueix-Lerosey, données non publiées). Malheureusement, les valeurs d'IC₅₀ mesurées 72h après la transfection de SiYAP seul, ou de SiYAP plus SiTAZ simultanément, dans des cellules A549 résistantes, ne sont significativement pas différentes. Là encore, l'efficacité de la transfection a été contrôlée par Western Blot, 72h après transfection des cellules. Si le composé CV2640, en inhibant l'interaction YAP/TAZ/TEAD, réduit la résistance au paclitaxel dans notre lignée cellulaire YAP-dépendante, mais que le knock-down de YAP ou de YAP et TAZ ne permet pas de reproduire cet effet, nous avons émis l'hypothèse que l'effet du composé pouvait en fait passer par TEAD. En effet, YAP n'interagit pas directement avec l'ADN et TEAD a été décrit comme le principal facteur de transcription se liant l'ADN, alors que YAP et TAZ ne font que moduler son activité transcriptionnelle en se liant à lui. Des quatre isoformes de TEAD, TEAD4 a été la plus étudiée dans la littérature. TEAD4 est capable, en l'absence de YAP/TAZ, de lier d'autres cofacteurs comme les protéines VGLL avec une modification de sa spécificité transcriptionnelle. Les protéines de la famille TEAD, en particulier TEAD4, ont été impliquées dans la tumorigenèse et la progression tumorale, dans de nombreux modèles de cancers comme dans les cancers du poumon, du sein, de l'estomac, dans les ostéosarcomes et les cholangiocarcinomes. (84,86,206,207). Le niveau d'expression de TEAD4 semble être plus élevé dans les tissus tumoraux d'adénocarcinome pulmonaire et est significativement associé

à un pronostic plus défavorable (208). Ainsi, nous avons donc voulu étudier la chimiorésistance au Paclitaxel de la lignée A549 résistante via des expériences d'IC50 du paclitaxel avec ou non inhibition spécifique de TEAD4 au moyen d'un ARN interférents publiés dans la littérature, et dont la séquence a été ree-testée dans les banques de données pour en vérifier la spécificité d'hybridation sur TEAD-4 (209). Malheureusement, l'extinction de TEAD4 n'a jamais pu être visualisée sur nos expériences de Western Blot. Nous avons ainsi réalisé de multiples Western Blot avec des conditions différentes (concentrations et transfectant différents), mais une extinction optimale n'a jamais été objectivée. Devant ces résultats décevants, aucune expérience d'IC50 du paclitaxel en présence de siTEAD n'a pu être initiée avant la fin de ma thèse. Ces expériences négatives n'ont pas été présentées dans l'article.

Il sera donc important de poursuivre ces expériences afin d'invalider plusieurs TEAD avec des ARN-interférents pour permettre de nouvelles expériences d'IC50 du paclitaxel après invalidation des TEAD, et tenter de démontrer l'effet de ces invalidations sur la restauration de la chimio-sensibilité au paclitaxel. Nous ne pouvons exclure non plus que le composé 2640 ait un effet off-target rendant compte de son effet sur la chimiorésistance. De même la cinétique courte des expériences avec ARN interférent de type si pourrait ne pas récapituler l'effet d'un inhibiteur pharmacologique, justifiant un véritable KO par la technologie CRISPR. Une telle approche nécessitant du temps de mise au point excédait cependant la durée de cette thèse et sera protégée par d'autres étudiants au sein de l'équipe.

Les résultats présentés concernent majoritairement des lignées cancéreuses qui constituent des modèles très artificiels et éloignés de la réalité clinique, du fait de l'accumulation *in vitro* au fil des années de cultures de multiples aberrations génétiques par ces lignées.

Afin de nous rapprocher au plus près de la réalité, et ce sera ma tâche pour les deux années à venir en post-thèse, nous souhaitons poursuivre l'analyse de l'effet des composés anti-YAP/TEAD sur la sensibilité au paclitaxel et/ou à l'immunothérapie, sur des modèles de tumeurs fraîches cultivés en 3D, constitués de co-cultures de cellules purifiées à partir de prélèvements frais de patients. Cette approche a pour intérêt de reproduire un microenvironnement tumoral certes imparfait, dans sa complexité, mais comprenant des fibroblastes comme des cellules T autologues, au plus proche d'un modèle immunocompétent *in vivo* (à l'inverse des PDX développés sur souris immunodéprimées).

Confirmer l'effet du composé Inventiva sur des cellules issues de patients marquerait un tournant dans notre approche pour identifier une cible prometteuse permettant sensibiliser tumeurs broncho pulmonaires à la chimiothérapie et/ou à l'immunothérapie. Grâce à l'expertise de l'équipe U830 Inserm de l'Institut Curie, nous avons pu utiliser la méthode de « Tumor On Chip » mise au point ces dernières années (6). Après acceptation par le comité d'évaluation des protocoles de recherche observationnelle (**ANNEXE 2 - CEPRO 2020-051**) de la SPLF le 25 Aout 2020, nous avons donc pu ainsi débiter l'étude de l'effet de différentes drogues (tels que le composé CV2640 et/ou le paclitaxel) sur la mort des cellules cancéreuses issues de tumeurs fraîches isolées à partir de pièces opératoires de patients opérés à Bichat pour un CBNPC sans traitement néo-adjuvant. A l'heure actuelle, même si l'équipe U830 Inserm y travaille depuis plusieurs années, aucune méthode automatisée n'est encore décrite pour calculer précisément le taux de survie des cellules cancéreuses issues de tumeurs fraîches. Les quelques expériences que j'ai pu réaliser au laboratoire nous ont permis d'accumuler des données encourageantes sur l'efficacité du composé CV2640 en association au paclitaxel dans ce système expérimental *ex-vivo*. Néanmoins, les résultats que nous avons montré dans l'article, ne proviennent que d'une seule tumeur et le comptage des cellules vivantes et mortes a été réalisé manuellement, une amélioration de l'algorithme STAMP, dite "supervised STAMP" étant en cours de validation, pour tenir compte de la pousse des cellules fraîches en grappes, ce qui rend le décompte automatique très difficile. Même si le composé CV2640 semblait dans ce système expérimental de culture tridimensionnelle de cellules fraîches, avoir une réelle efficacité en association avec le paclitaxel, et que cette nouvelle méthode constituait une réelle avancée, ces résultats nécessiteront de toutes façons d'être confirmés sur une série importante d'échantillons. Par ailleurs, une fois que le logiciel d'automatisation « supervised STAMP" sera validé sur cellules cancéreuses fraîches, nous espérons disposer du nouvel inhibiteur développé par Inventiva, fruit de l'optimisation biochimique d'une nouvelle série de composés dont l'activité serait cette fois de l'ordre de 50 nM, permettant alors réellement d'envisager, une fois les étapes précliniques franchies, une utilisation chez l'homme. De fait plusieurs industriels semblent développer de tels inhibiteurs de YAP/TEAD, et un essai de première administration chez l'homme, chez des patients avec mesotheliome pleural et mutation de NF2 (donc YAP activé), a été lancé aux USA par la Société Ikena Oncology avec le IK930-001, présenté comme un inhibiteur oral de TEAD à 25 mg/ jour (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05228015), après des expériences qui montreraient une efficacité sur des modèles de PDX mais n'ont pas été publiées à ce jour.

CONCLUSION

Ainsi, l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus par des approches complémentaires, semblent confirmer que dans les lignées cellulaires de cancer bronchique non à petites cellules, l'activité de YAP est augmentée dans les lignées cancéreuses résistantes au paclitaxel. En effet, nous avons établi qu'il existait dans nos lignées cellulaires une surexpression de la signature transcriptomique YAP (séquençage ARN) , mais aussi une augmentation de l'activité transcriptionnelle YAP/TEAD (test luciférase), ainsi que la persistance d'une localisation nucléaire prédominante de YAP (immunofluorescence). Nous avons montré qu'un inhibiteur pharmacologique de l'interaction YAP/TEAD pouvait réduire la résistance au paclitaxel, même si cet effet n'a pas pu, à ce jour être récapituler par une approche d'invalidation génétique, pouvant suggérer un effet off-target non encore élucidé autant qu'une approche technologique (l'ARN-interférence) inadaptée. Le composé CV2640 a malheureusement une efficacité imparfaite puisque son activité nécessite des doses trop importantes pour l'utilisation chez l'homme (de l'ordre de 10 micro-molaire).

Au total, nos données plaident pour cette implication de l'activité transcriptionnelle de YAP dans l'acquisition de cette résistance. Notre équipe avait par le passé récent montré à quel point le rôle de la signalisation Hippo/YAP était important dans l'acquisition par le cancer bronchique non à petites cellules, d'un phénotype invasif, après invalidation du gène suppresseur de tumeur RASSF1A, ce que nos expériences d'inhibitions pharmacologique de la migration cellulaire ont confirmé. Ainsi, l'interaction YAP pourrait donc constituer une cible thérapeutique prometteuse dans les cancers pulmonaires ou les mésothéliomes dans lesquels cette voie de signalisation est dérégulée. La mécanistique précise de l'effet de l'inhibition pharmacologique de YAP reste à élucider, ainsi que l'effet de nouveaux inhibiteurs sur des modèles micro-fluidiques 3D à partir de tumeurs fraîches, ce qui fera l'objet de nos études futures.

ANNEXE 1 – Article « MST1/Hippo promoter gene methylation predicts poor survival in patients with malignant pleural mesothelioma in the IFCT-GFPC-0701 MAPS Phase 3 trial ». *Maille E, Brosseau S, Hanoux V, Creveuil C, Danel C, Bergot E, et al. Br J Cancer.* 19 févr 2019



ARTICLE

Clinical Study

MST1/Hippo promoter gene methylation predicts poor survival in patients with malignant pleural mesothelioma in the IFCT-GFPC-0701 MAPS Phase 3 trial

Elodie Maille^{1,2}, Solenn Brosseau³, Vincent Hanoux⁴, Christian Creveuil⁵, Claire Danel⁶, Emmanuel Bergot^{2,7}, Arnaud Scherpereel⁸, Julien Mazières⁹, Jacques Margery¹⁰, Laurent Greillier^{11,12}, Clarisse Audigier-Valette¹³, Denis Moro-Sibilot¹⁴, Olivier Molinier¹⁵, Romain Corre¹⁶, Isabelle Monnet¹⁷, Valérie Gounant¹⁸, Alexandra Langlais¹⁹, Franck Morin¹⁹, Guénaëlle Levallet^{19,20} and Gérard Zalcman^{3,21}

BACKGROUND: The Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS/NCT00651456) phase 3 trial demonstrated the superiority of bevacizumab plus pemetrexed–cisplatin triplet over chemotherapy alone in 448 malignant pleural mesothelioma (MPM) patients. Here, we evaluated the prognostic role of Hippo pathway gene promoter methylation.
METHODS: Promoter methylations were assayed using methylation-specific polymerase chain reaction in samples from 223 MAPS patients, evaluating their prognostic value for overall survival (OS) and disease-free survival in univariate and multivariate analyses. MST1 inactivation effects on invasion, soft agar growth, apoptosis, proliferation, and YAP/TAZ activation were investigated in human mesothelial cell lines.
RESULTS: STK4 (MST1) gene promoter methylation was detected in 19/223 patients tested (8.5%), predicting poorer OS in univariate and multivariate analyses (adjusted HR: 1.78, 95% CI (1.09–2.93), $p = 0.022$). Internal validation by bootstrap resampling supported this prognostic impact. MST1 inactivation reduced cellular basal apoptotic activity while increasing proliferation, invasion, and soft agar or in suspension growth, resulting in nuclear YAP accumulation, yet TAZ cytoplasmic retention in mesothelial cell lines. YAP silencing decreased invasion of MST1-depleted mesothelial cell lines.
CONCLUSIONS: MST1/hippo kinase expression loss is predictive of poor prognosis in MPM patients, leading to nuclear YAP accumulation and electing YAP as a putative target for therapeutic intervention in human MPM.

British Journal of Cancer (2019) 120:387–397; <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0379-8>

BACKGROUND

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare yet aggressive cancer with poor prognosis mainly caused by occupational asbestos exposure.¹ Recently, the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS) demonstrated the benefit of bevacizumab plus cisplatin/pemetrexed doublet combination on both overall (OS) and progression-free survival (PFS) in 448 MPM patients.² Following this trial, a biological study (Bio-MAPS) is currently evaluating new biomarkers, including the Hippo mammalian sterile 20-like kinase (MST1), as MPM has recently been proven to harbour frequent Hippo pathway alterations.³

MST1 (also named STK4), encoded by the human orthologue of the *Drosophila melanogaster* Hippo gene, and MST2 (STK3) are the best characterised of the five MST kinases (MST1/2/3/4 and YSK1) existing in mammals. MST1/2 primary function is to activate/phosphorylate the large tumour suppressor homologue 1/2 (LATS1/2) kinases, which in turn regulate the Yes-associated protein (YAP) and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) activities. Inactive/phosphorylated YAP/TAZ are sequestered in the cytoplasm by proteins such as 14.3.3 or beta-catenin, while active/dephosphorylated YAP/TAZ interact with numerous transcription factors and cause transcription of genes

¹Normandie Université, UNICAEN, INSERM, UMR 1086 ANTICIPE, Caen, France; ²Normandie Université, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, GIP CYCERON, Caen, France; ³Department of Thoracic Oncology & CIC1425, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Université Paris-Diderot, Paris, France; ⁴Normandie Université, UNICAEN, UPRES-EA 2608, Caen, France; ⁵Biomedical Research Unit, CHU de Caen, Caen, France; ⁶Department of Pathology, Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Université Paris-Diderot, Paris, France; ⁷Department of Pulmonology & Thoracic Oncology, CHU de Caen, Caen, France; ⁸Department of Pulmonary and Thoracic Oncology, Centre Hospitalier Universitaire Lille, University of Lille, U1019 INSERM, Center of Infection and Immunity of Lille, Lille, France; ⁹Department of Pulmonology, Hôpital Larrey, University Hospital of Toulouse, Toulouse, France; ¹⁰Medical Oncology Department, Gustave Roussy, Villejuif, France; ¹¹Department of Multidisciplinary Oncology and Therapeutic Innovations, Assistance Publique Hôpitaux de Marseille, Aix Marseille University, Marseille, France; ¹²Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), INSERM UMR1068, CNRS UMR7258, Aix-Marseille University, UM105 Marseille, France; ¹³Department of Pulmonology, Centre Hospitalier Toulon Sainte-Musse, Toulon, France; ¹⁴Pôle Thorax et Vaisseaux, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble, Grenoble, France; ¹⁵Department of Pulmonology, Centre Hospitalier Le Mans, Le Mans, France; ¹⁶Department of Pulmonology, Pontchaillou University Hospital, Rennes, France; ¹⁷Department of Pulmonology, Centre Hospitalier Intercommunal Créteil, Créteil, France; ¹⁸Department of Pulmonology, Hôpital Tenon, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France; ¹⁹Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT), Paris, France; ²⁰Department of Pathology, CHU de Caen, Caen, France and ²¹U830 INSERM "Genetics and Biology of Cancers, A.R.T group", Curie Institute, Paris, France

Correspondence: Gérard Zalcman (gerard.zalcman@aphp.fr)
 Both supervising authors contributed equally: Guénaëlle Levallet, Gérard Zalcman

Received: 5 September 2018 Revised: 15 December 2018 Accepted: 20 December 2018
 Published online: 11 February 2019

involved in cell motility, growth, proliferation, and apoptosis.⁴ Thus, MST1 or MST2 loss results in hyperproliferation and tumorigenesis, commonly negated by YAP inactivation.⁵ MST1/2 kinases were also reported as contributing to the regulation of (i) apoptosis by establishing a complex with RASSF1A and CNK1 proteins^{6,7} or with the apoptosis-inhibiting protein kinase CK2,⁸ (ii) cell-cycle progression by catalysing the mitotic phosphorylation of MOBK1A/1B,⁹⁻¹³ and (iii) migration/invasion processes by stabilising lamellipodial F-actin.¹⁴⁻¹⁶

Several studies suggest that Hippo signalling pathway deregulation is involved in pleural carcinogenesis, since the RASSF1A tumour suppressor gene, an upstream negative regulator of the pathway, is frequently methylated and inactivated in MPM.^{17,18} In our study, we first established a correlation between MST1 kinase gene promoter methylation and reduced OS in MPM patients. By transfecting cells with RNAi-MST1, we further reported that MST1 inactivation increases proliferation, invasion, and cell colony formation of MPM cell lines while decreasing their basal apoptotic activity. Finally, we demonstrated that the effect of MST1 expression loss depends on inappropriate activation of YAP.

METHODS

Patients from the MAPS trial

From 13 February 2008 to 5 January 2014, 448 patients were randomly assigned to one of two treatments (223 (50%) to pemetrexed plus cisplatin and bevacizumab and 225 (50%) to pemetrexed plus cisplatin). Specific informed consent was obtained for the biological studies (Bio-MAPS), and the trial was approved by the appropriate ethics committee (CPP Ref 2007-20 Nord-Ouest III, France).

DNA extraction and methylation-specific PCR assay

DNA samples from MPM were obtained from paraffin-embedded tumour tissue using the QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen). Genomic DNA bisulphite modification was performed using the Epitect kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions and as previously described.¹⁹ Polymerase chain reaction (PCR) was conducted with specific primers for either the methylated or unmethylated alleles (Table S1) in standard conditions for the following genes encoding proteins of the Hippo pathway or RASSF superfamily: RASSF1A, RASSF2A, RASSF5, RASSF10, MST1 (Figure S1), MST2, LATS1, and LATS2. RASSF6 methylation status was determined by the COBRA technique, as previously described.²⁰

Cell culture and transfection

Human MPM cell lines MSTO-211H, NCI-H2452, NCI-H28, and NCI-H2452 from the American Tissue Culture Collection (ATCC) were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 10 mM L-glutamine and streptomycin/penicillin, and kanamycin (100 µg/ml). Cells were transfected using JetPRIME[®] (Polyplus-transfection[®]) with small-interfering ribonucleic acid (siRNA) or plasmid DNA, as listed in Table S2.

Reverse transcription-quantitative real-time PCR

After RNA extraction, reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was performed with primer sets (Table S3) as previously described.²¹ RT-qPCR data were normalised to the human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Relative quantification was calculated using the delta-delta-Ct method.

Immunoblotting

Whole-cell protein extracts were prepared as previously described,²² and proteins were detected by immunoblotting with the primary antibody from cell signalling (E-Cadherin, MST1, YAP/TAZ, P-Ser127YAP, GAPDH, vimentin), diluted to 1:1000 in Tween (0.1%)–tris-buffered saline buffer and horseradish

peroxidase-conjugated secondary antibody, and then revealed by enhanced chemiluminescence using the ECL kit (Promega[™]). Densitometry results of western blot were analysed with ImageJ software. The signal intensity of each band was normalised with GAPDH densitometry values.

Immunofluorescence and image analysis

Transfected cells were fixed and permeabilised as previously described.²⁰ The primary antibodies were YAP (Cell Signaling, 1/150), TAZ (Cell Signaling, 1/150), alpha-tubulin (Sigma Aldrich, 1/300), actin (Cell Signaling, 1/300), Fascin (Cell Signaling, 1/300) or cytochrome C (BD Biosciences, 1/50). The AlexaFluo633, AlexaFluo555 or 488-labelled (Invitrogen[™]) secondary antibodies were added for 1 h. Coverslips were mounted with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Santa Cruz[™]) and images captured using high-throughput confocal microscopy (FluoView FV1000, Olympus[™]).

Quantification and measure of cell cytoplasmic extensions

After immunolabeling tubulin filaments, number and length of cytoplasmic extensions from almost 200 cells were assayed from 10 images captured randomly at 20× objective with a high-throughput confocal microscopy (FluoView FV1000, Olympus[™]) using ImageJ software (version 1.50d).

Invasion

A total of 15×10^3 cells were added in serum-free medium to the top invasion chambers of 24-well transwell plates containing cell culture insert with 8 µm pores (BD BioCoat Matrigel[®] Invasion Chamber, BD Biosciences[™]). Complete media supplemented with hepatocyte growth factor were added to the bottom chambers. Cells were incubated for 48 h and then removed; migrating (bottom) cells were stained with crystal violet.

Soft agar assay

Base agar matrix (100 µl, Cell Biolabs) was seeded in a 96-well plate and 1500 cells/well layered on agar followed by 50 µl of 2× complete medium. After 25 days, colonies were stained and counted for each well.

Spheroid culture

At 24 h post transfection, cells were reseeded with complete medium in 24-well plates without adhesion (Nunclo[™] Sphera[™] Microplates, Thermo Fisher Scientific). Sphere formation was evaluated on day 6 at ×10 magnification with a phase-contrast inverted microscope.

Apoptosis measurement

DNA fragmentation and Caspase 3/7 activation were assayed using the Cell Death Detection ELISA plus kit (Roche, USA) and the Caspase-Glo 3/7 Luminescence Assay (Promega Corp. Madison, WI, USA), respectively, according to the manufacturer's instructions.

Bromodeoxyuridine incorporation

Cells were transfected, left for 24 h, then labelled with bromodeoxyuridine (BrdU) (1:500 dilution, cell proliferation assay, Millipore) for a further 24 or 48 h. BrdU incorporation was measured according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The Bio-MAPS study was a pre-planned ancillary and exploratory study. The characteristics of patients with promoter methylation analysis were compared to those without using chi-squared tests or Fisher's exact tests for qualitative variables, and Student's *t*-tests or Mann–Whitney tests for quantitative variables.

The prognosis value of MST1 promoter hypermethylation was assessed for PFS and OS using univariate and multivariate Cox models. Cofactors introduced to the multivariate model were:

treatment arm, stratification factors used in the MAPS trial (histology, performance status (PS), and smoking status), and clinical factors known to be associated with survival (gender, age, sex, haemoglobin, white blood cells, and platelets).

Hazard ratios (HRs) were estimated with their 95% confidence intervals (95% CIs). Bootstrap resampling was used to assess the model's stability and the optimism-corrected concordance index (c-index). The data were analysed with IBM SPSS software Version 22.0.

In vitro data are presented as means ± SEM; each experiment was performed at least three times independently. Statistical differences were determined either by one-way analysis of variance (ANOVA) or Dunnett's multiple comparison test to compare each experiment's condition with siMST1 (GraphPad Software, Inc. USA). Statistical significance was set at $p \leq 0.05$.

RESULTS

MST1 promoter hypermethylation predicts shorter OS of MPM patients

Assessing the baseline characteristics of patients from the MAPS trial reveals that biological parameters (haemoglobin, platelet count, leucocyte count), general status (PS 0–1 versus >2), and histology (epithelioid vs. sarcomatoid/mixed) are potent prognostic factors of OS ($p < 0.05$) and PFS in univariate and multivariate analyses (2) in this subset of MAPS patients. The baseline characteristics of the 223 patients in whom gene methylation assays were performed did not differ from those of patients for whom such analyses were not possible (Table S4). RASSF1A, RASSF2A, RASSF6, and RASSF10 were found to be methylated in 11.1%, 14.5%, 21.5%, and 4.4% of samples, respectively, while no sample exhibited any RASSF5, MST2, LATS1, or LATS2 methylation. None of these methylations influenced survival in univariate analysis (data not shown).

MST1 promoter methylation status was available for 223/448 patients from MAPS (Fig. 1a), and MST1 promoter was methylated in 19/223 samples (8.5%) (representative methylation-specific PCR (MS-PCR) are shown in Figure S1).

In univariate analysis, the median OS of patients with methylated MST1 promoter was 1.4 times lower than that of patients with unmethylated MST1 promoter (13.0 versus 19.3 months, HR: 2.40, 95% CI [1.48–3.90], $p < 0.001$) (Fig. 1b). Moreover, univariate analyses showed that methylation of MST1 gene predicted worse survival in each treatment group separately, with HR = 2.29 (95% CI 1.13–4.65), $p = 0.021$ for the chemotherapy arm and 2.50 (95% CI 1.27–4.90), $p = 0.0079$ for the bevacizumab arm (Figure S2).

This result was confirmed in multivariate analysis in the whole series, both treatment arms analysed together (adjusted HR: 1.78, 95% CI [1.09–2.93], $p = 0.022$, adjustment for gender, age, histology, PS, haemoglobin, leucocyte and platelet counts, smoking, and treatment arm) (Fig. 1b), and validated by a bootstrap procedure: MST1 methylation was significantly associated with worse OS in 59% of 1000 bootstrapped samples, with an optimism corrected c-index of 0.67.

When the multivariate analysis was performed separately in the two treatment arms, the survival impact only remained significant in the bevacizumab arm (HR: 2.37, (95% CI [1.16–4.83]), $p = 0.017$). However, an adjusted interaction test did not support MST gene methylation predictive value, with adj. HR: 1.44 (95% CI 0.71–2.93), $p = 0.38$ (Figure S2).

Finally, MST1 inactivation did not significantly predict PFS for MPM patients, although there was a correlating trend of a deleterious impact (HR: 1.53, 95% CI [0.95–2.46], $p = 0.082$ in univariate analysis).

MST1 depletion modifies human mesothelial cell stretching

Since MST1 methylation status was the only alteration found to significantly influence prognosis in our large series of MPM

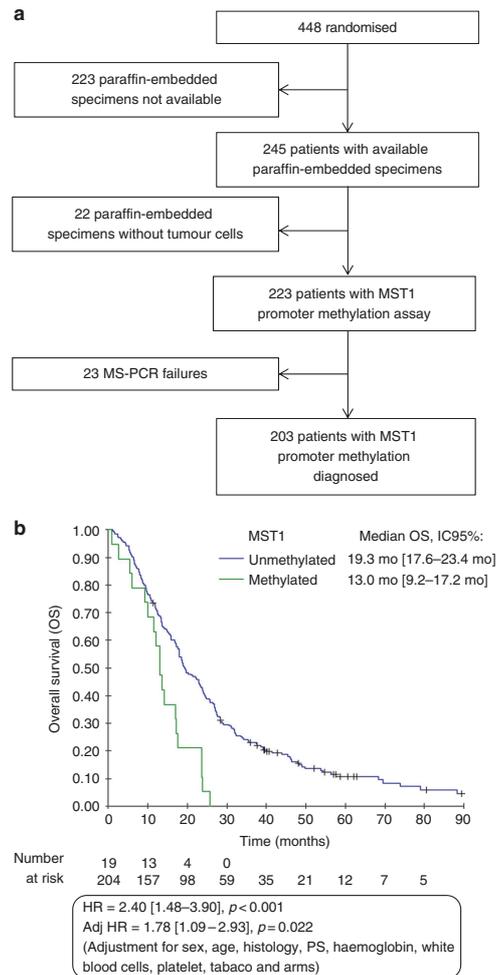


Fig. 1 a Flow chart. b Kaplan–Meier curve of overall survival according to the MST1 promoter status (methylated or unmethylated)

patients, we focussed our functional mesothelial cell studies on this protein's role.

MST1 was silenced in four human mesothelial cell lines (MSTO-211H, H2452, H28, and H2452) with normal basal MST1 expression (as evidenced by MS-PCR and qRT-PCR, data not shown), using siRNA-MST1. After testing several small interfering RNA (siRNA) sequences, we retained two that decreased both MST1 mRNA and protein expression by at least 40% in MPM cells (Fig. 2a, b, S3A). To validate the specificity of the effects observed in the absence of MST1, we have also introduced an experimental condition in which the cells are transfected with both a siMST1 and a plasmid carrying the coding sequence of MST1. The plasmid was brought at a concentration determined to overcome the amount of siRNA silencing the endogenous MST1 (Fig. 2a, b, S3A).

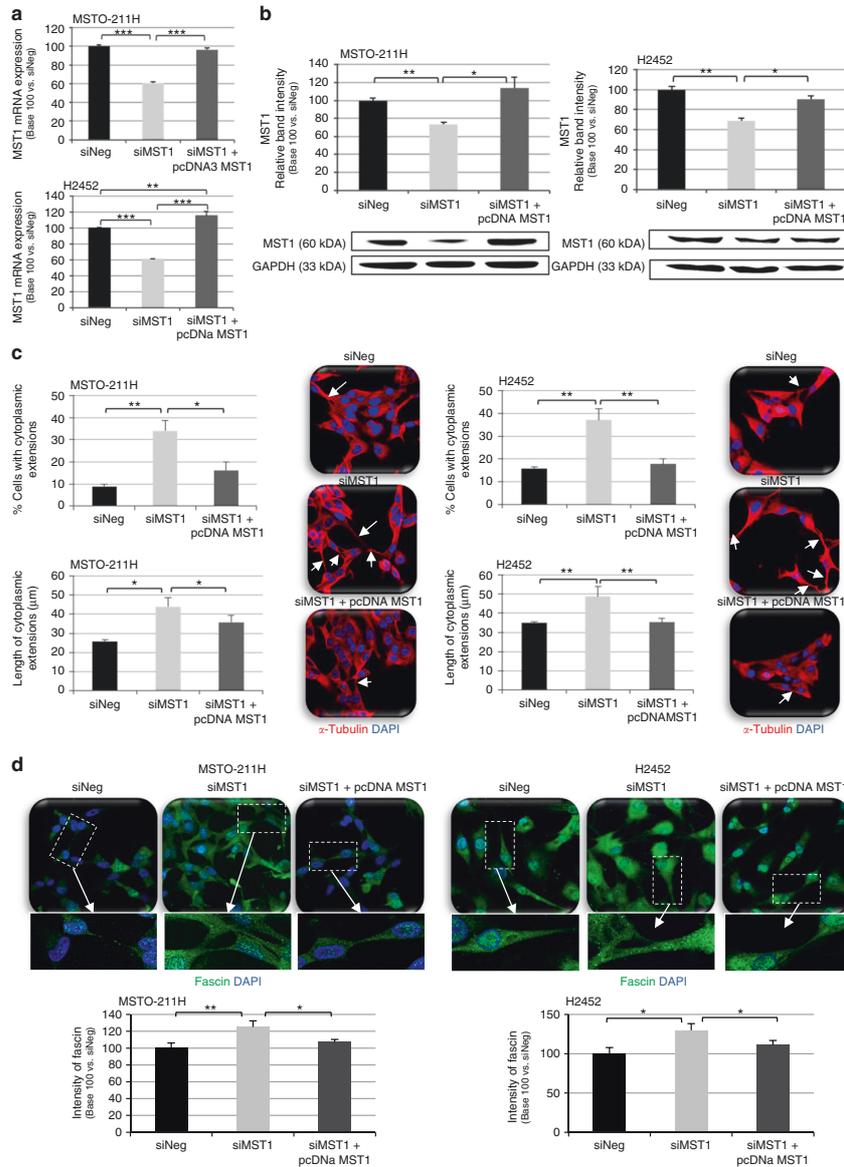


Fig. 2 MST1 depletion causes morphological changes. **a-d** MST0-211H and H2452 cells were transfected with siNeg, siMST1, or siMST1+pcDNAMST1, analysed 48 h after transfection. Expression of MST1 was analysed by reverse transcription-quantitative real-time PCR (RT-qPCR) (**a**) and western blot (**b**), using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as an internal control. Quantification of number of cytoplasmic extensions and their size (µm) after α-Tubulin staining (**c**) and quantification of Fascin expression (**d**) by immunofluorescence and confocal microscopy in almost 200 cells using ImageJ software. Representative confocal pictures (**c, d**) are presented for cells stained for α-Tubulin (red), Fascin (green), and nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). For all histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001, using an analysis of variance (ANOVA) test followed by Dunnett's test

As evidenced by alpha-tubulin immunostaining, MST1-depleted cells were much more "stretched" than cells transfected with a control siRNA (siNeg). The shape of MSTO-211H or H2452 cells (Fig. 2c) (as H2052 and H28, data not shown) appeared significantly modified, and MST1 knockdown cells exhibited more cytoplasmic extensions than mock-transfected cells. Epithelial (E-cadherin) and mesenchymal (vimentin) marker quantification revealed that the morphological changes induced by MST1 loss were not caused by an epithelial-mesenchymal transition, since we found no typical expression switch between epithelial and mesenchymal markers (data not shown).

Cytoplasmic expansions from MST1-depleted cells were shown to be actual filopodia, as confirmed by the fascin enrichment in these structures (Fig. 2d), thus suggesting an increased ability for cell migration upon MST1 knockdown.

MST1 loss increases invasion and growth in agar of MPM cells. We observed that MST1 depletion significantly increased the ability of MSTO-211H, H2452 (Fig. 3a), H28, and H2052 (Figure S3B) cells to invade Matrigel[®]. Moreover, colony formation on soft agar was increased by MST1 depletion in MSTO-211H, H2452 (Fig. 3b), H28, and H2052 (Figure S3C).

Finally, by impeding substrate-cell attachment, we caused spheroid formation increase in MSTO-211H and H2452 cells in absence of the MST1 kinase (Fig. 3c). For MST1-depleted MSTO-211H cells, we also observed that the cells were more individualised than control cells, which necessarily group into cell clumps.

MST1 depletion decreases basal apoptosis and increases proliferation of MPM cells. MSTO-211H and H2452 cell lines transfected with siMST1 presented significantly reduced DNA fragmentation (Fig. 4a), suggesting decreased apoptosis. This result was consistent with the decreased caspase 3/7 activity also measured in the absence of MST1 in the MSTO-211H and H2452 cells (Fig. 4b), as in H28 and H2052 cells (Figure S3D), and the lower intensity of cytochrome C staining quantified in MSTO-211H and H2452 cells (Fig. 4c), all assays exploring apoptosis ability.

This basal apoptotic activity decrease in MST1-depleted cells was accompanied by increased cell proliferation for MSTO-211H and H2452 cells (Fig. 4d), or H28 and H2052 cells (Figure S3E), as measured by BrdU incorporation.

MST1 loss leads to nuclear YAP accumulation but TAZ cytoplasmic retention

MST kinases are known to activate LATS kinases,⁴ which in turn are able to phosphorylate YAP, inducing either YAP cytoplasmic sequestration or YAP proteasome degradation.⁴ It should be noted that in MSTO-211H cells, cells with LATS1 kinase inactivation,²³ the Hippo pathway remains functional as demonstrated by the increase of phosphorylation on the serine 127 of YAP with increasing cell density (Figure S4A) and the concomitant decrease in intensity of nuclear YAP (Figure S4B), LATS1 inactivation being probably compensated by another NDR kinases.

By using immunocytochemistry, we actually found that MST1 depletion led to nuclear YAP accumulation, suggesting a decrease in YAP phosphorylation. Conversely, using specific TAZ antibodies, we observed a decrease in nuclear TAZ, a YAP close homologue, in MSTO-211H and H2452 mesothelial cells (Fig. 5a).

We evaluated YAP/TAZ transcriptional activity by quantifying the expression of YAP/TAZ target genes: *CTGF*, *ANKDR1*, and *Cyr61*. *CTGF* expression did not significantly vary upon MST1 depletion (data not shown), while *ANKDR1* and *Cyr61* expression actually significantly increased by 1.6- to 2.5-fold, as shown in H2452 (Fig. 5b) and H2052 cells (Fig. 5c).

Western blot analyses further confirmed that YAP protein was more expressed in MST1-depleted MPM cell lines, while TAZ protein was less expressed. Furthermore, YAP protein should

accumulate under its active form as evidenced by the P-Ser127YAP decrease detected in these cells, this form being reputed to be inactive (Fig. 5d).

We next evaluated apoptosis activity, invasion, and colony formation of MPM cell lines in the absence of either YAP or TAZ (Fig. 6, Figure S5). We found that YAP and TAZ extinction actually decreased MPM cell invasion (Fig. 6a, Figure S5,A) and colony numbers (Fig. 6b, Figure S5,B), and increased caspase 3/7 activity (Fig. 6c, Figure S5,C). Thus, the aggressive cell phenotype induced by MST1 loss could result from YAP cytoplasmic-to-nuclear shuttle and TAZ cytoplasmic retention. By silencing YAP in MST1-depleted MSTO-211H or H2452 cells, in line with such hypothesis, we were finally able to decrease their invasion through Matrigel[®] (Fig. 6d).

DISCUSSION

Today, there is still no oncogenic "driver" identified in MPM enabling targeted therapeutics to be developed.²⁴ To identify such a putative driver, the Bio-MAPS study set out to characterise the molecular abnormalities in tumours from patients enrolled in the MAPS phase 3 trial. Focusing on Hippo pathway alterations, we assayed MST1 gene promoter hypermethylation, for the first time to our best knowledge, in a subset (8.5%) of MPM patients. MST1 promoter hypermethylation had been previously described in not only other cancers such as sarcoma¹⁸ and head and neck squamous cell carcinomas,²⁵ but also in non-cancer diseases like autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis.²⁶ While MST1 inactivation had not previously been evidenced in MPM, our findings are in line with the reports of frequent genetic alterations of Hippo pathway members recently revealed in MPM²³ and support the concept that Hippo pathway alterations are key events in pleural carcinogenesis.^{23,27,28}

Interestingly, our study further revealed that the hypermethylation of MST1 promoter is associated with significantly worse OS for MPM patients, which is consistent with its tumour suppressor function and biomarker potential status. Our findings are consistent with those already reported in the literature for other cancers, such as breast cancer,²⁹ hepatocellular carcinoma,³⁰ and colorectal cancer.³¹

By mimicking MST1 loss in mesothelioma cell lines via MST1 RNA interference (RNAi) transfection, we demonstrated that MST1 prevented nuclear YAP accumulation while permitting TAZ cytoplasmic retention in mesothelial cells, thus inhibiting cell motility, growth without anchorage, and proliferation, while controlling basal apoptosis. These results are consistent with data from the literature, where MST1 role in invasion, migration, apoptosis, and cell proliferation has already been documented in various cancer models,^{15,16,32-35} though not yet in MPM. Moreover, MST1 or MST2 loss is known to lead to hyperproliferation and tumorigenesis, which are commonly prevented by concurrent YAP inactivation.⁵ Conversely, MST1 overexpression induces apoptosis, inhibits proliferation and tumour growth, and leads to YAP phosphorylation on Ser127 (thus YAP inactivation), subsequently provoking *CTGF*, *AREG*, and *survivin* (YAP-target genes) downregulation in hepatocellular carcinoma³⁶ and non-small cell lung cancer.³⁷ In line with such reports, our study found that the nuclear YAP accumulation induced by MST1 depletion is consistent with a P-Ser127YAP decrease in MST1-depleted cells with *ANKDR1* and *Cyr61* gene transcription increase, supporting the fact that YAP accumulated under its active form in the nucleus. We also revealed that YAP inactivation in MST1-depleted cells was able to fully reverse their ability to invade Matrigel[®]. The increase in nuclear YAP in the absence of MST1 could explain the poorer OS in patients with MPM and the more "aggressive" phenotype of mesothelial cells at the cellular level. That loss of MST1 expression involving YAP has already been reported in the literature,³⁴ as has the involvement of YAP in the tumour progression of MPM, yet our

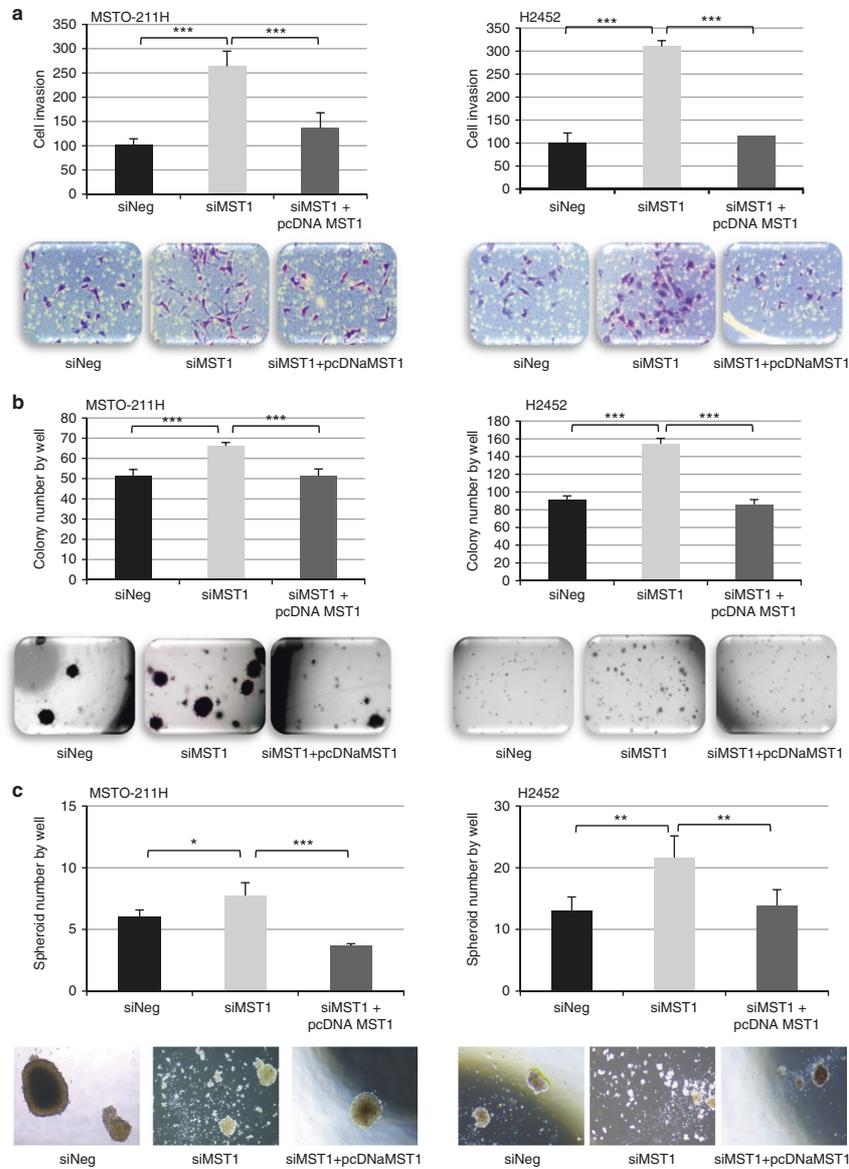


Fig. 3 MST1 depletion increases cell invasion and anchorage-independent growth and decreases spheroid diameter. **a–c** MSTO-211H and H2452 cells were transfected with siNeg, siMST1, or siMST1+pcDNAMST1, experiments were performed 48 h after transfection. **a** Invasion capacity of transfected cells on BioCoat Matrigel Invasion Chamber for 48 h. **b** Quantification of colonies in soft agar after 21 days. **c** Quantification of spheroid after 6 days. Representative picture is provided under histograms. For all histograms, error bars indicate the SEM of at least four independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, using an analysis of variance (ANOVA) test followed by Dunnett's test

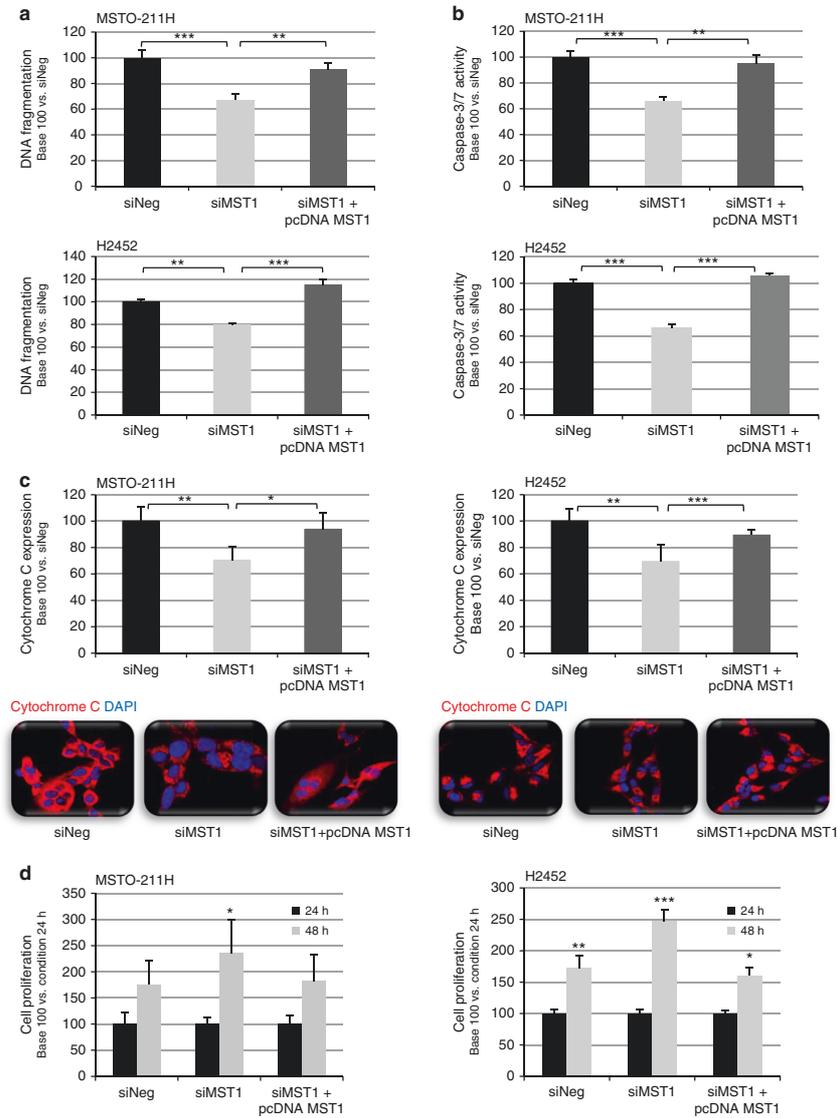


Fig. 4 MST1 depletion decreases apoptosis and increases cell proliferation. **a-d** MSTO-211H and H2452 cells were transfected with siNeg, siMST1, or siMST1+pcDNAMST1. Experiments performed 48 h after transfection. **a** Caspase 3/7 activity. **b** DNA fragmentation. **c** Quantification of cytochrome c (red) and representative immunofluorescent confocal picture, nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). **d** Cell proliferation assays. For all histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, using an analysis of variance (ANOVA) test followed by Dunnett's test

study was the first to identify Hippo kinase inactivation leading to YAP deregulation.

YAP has been evidenced as a potential therapeutic target in MPM patients.^{25,38,39} In line with our results, another team recently reported that YAP inactivation in the MSTO-211H cells, which

contain an inactive kinase-truncated LATS1 fusion protein and thus a constitutively nuclear active YAP by wild-type LATS1 kinase overexpression leading to YAP phosphorylation, was able to restore YAP to its cytoplasmic location, consisting of a surrogate marker for its functional inactivation. In such YAP-inactivated

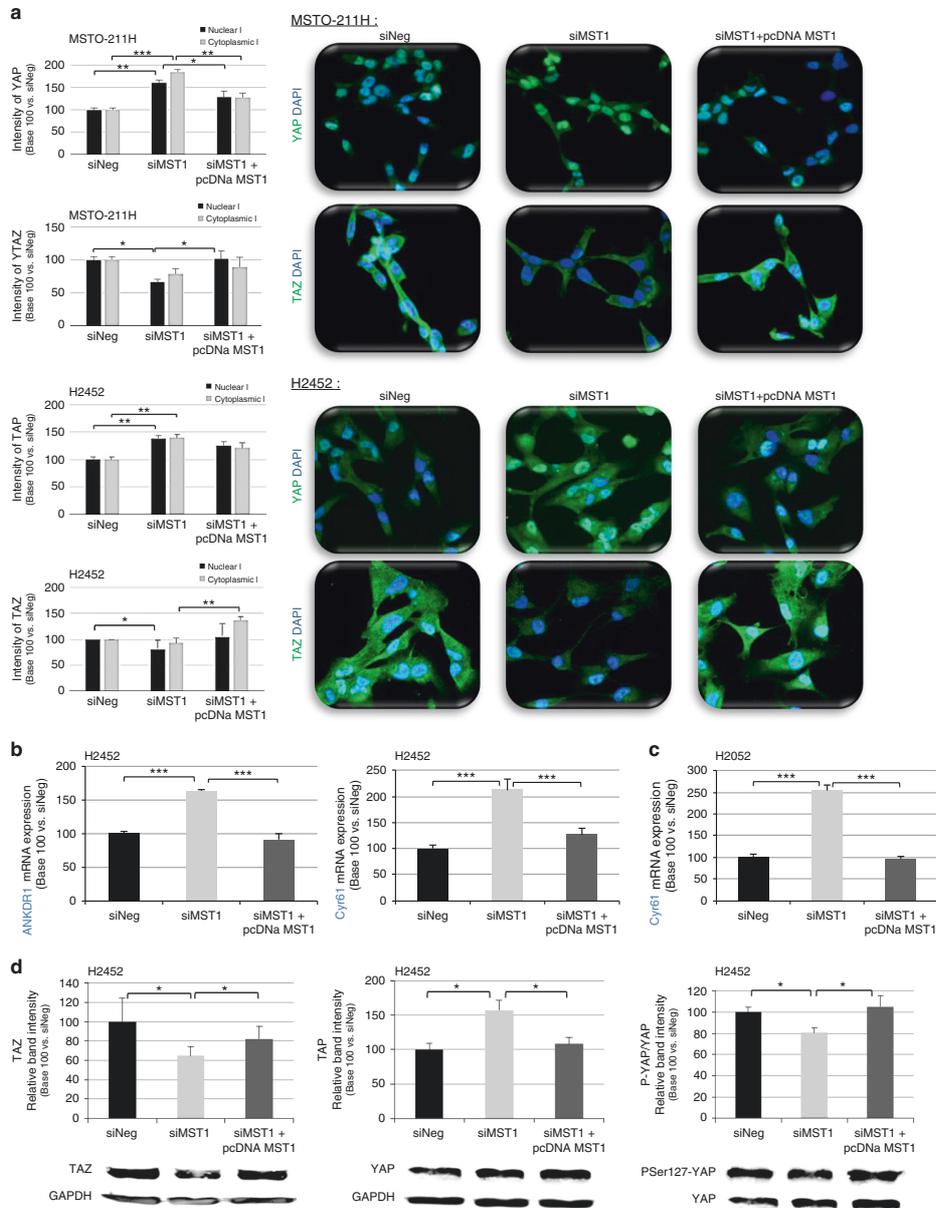


Fig. 5 MST1 depletion increases nuclear Yes-associated protein (YAP) but decreases nuclear transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ). **a–d** MSTO-211H, H2452, and H2052 cells were transfected with siNeg, siMST1, or siMST1+pcDNAMST1. Experiments performed 48 h after transfection. **a** YAP nuclear and cytoplasmic localisation assayed by immunofluorescence. YAP/TAZ activity by quantifying ANKDR1 expression in **b** H2452 or **c** H2052 cells. **d** Quantification of TAZ, YAP, and P-Ser127-YAP protein levels using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control. For all histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, using an analysis of variance (ANOVA) test followed by Dunnett's test

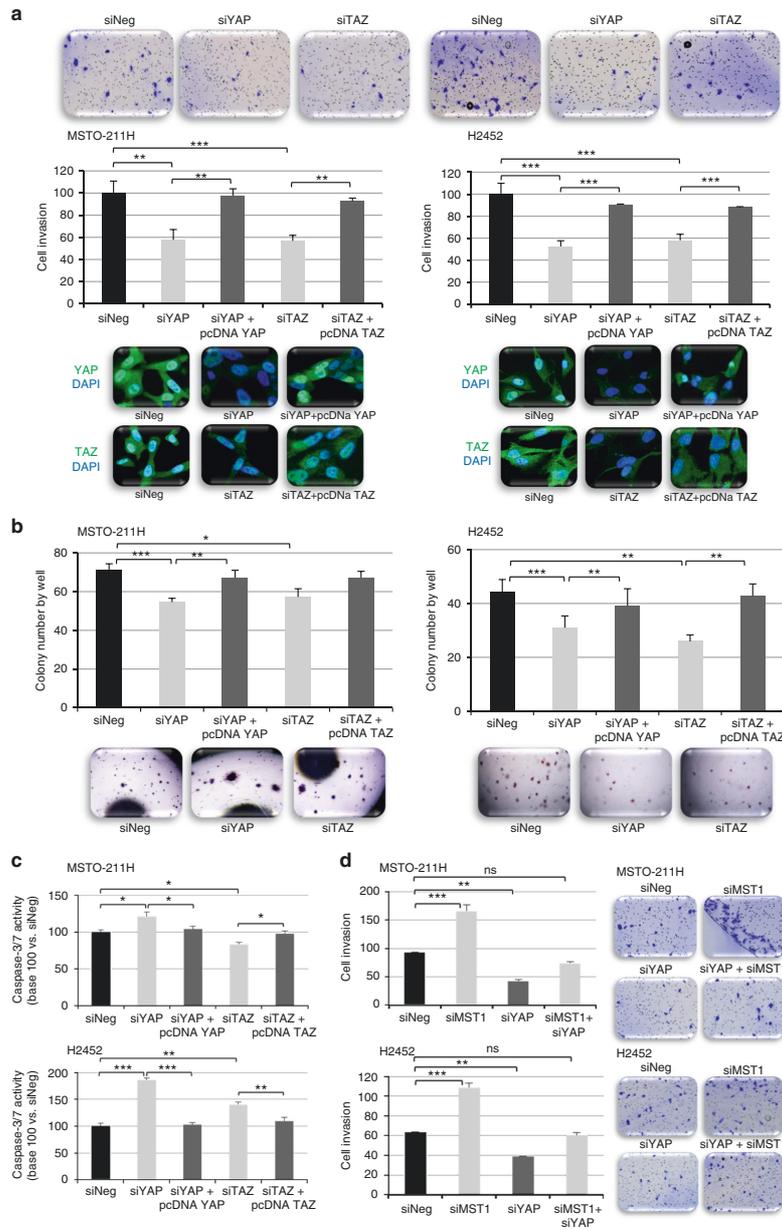


Fig. 6 Yes-associated protein (YAP) or transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) depletion decreases cell invasion and anchorage-independent growth while increasing apoptosis. **a–d** MSTO-211H and H2452 cells were transfected with siNeg, siYAP, siTAZ, and siMST1 in combination or not with pcDNA YAP or TAZ. Experiments performed 48 h after transfection. **a** Invasion capacity of transfected cells on BioCoat Matrigel Invasion Chamber; representative image of YAP and TAZ extinction shown under the histograms. **b** Quantification of colonies in soft agar after 21 days. Representative picture is provided above **(a)** or under **(b)** histograms. **c** Caspase 3/7 activity. **d** Invasion capacity of transfected cells on BioCoat Matrigel Invasion Chamber for 48 h. For all histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$, using an analysis of variance (ANOVA) test followed by Dunnett's test

MSTO-211H cells, adherent or anchorage-independent cell growth was suppressed, as was colony formation. Similarly, another team recently experimented with H2452 cells with wild-type LATS1, using YAP RNAi-mediated knockdown, demonstrating that such YAP depletion also inhibited the growth of H2452 mesothelial cells and significantly suppressed Hippo pathway transcriptional activity, with decreased invasion, tumorsphere formation, and impaired stem cell self-renewal capacity.³⁸ These data, along with our own findings, support the putative therapeutic potential of YAP inhibition in MPM.

Routinely performing MST1 methylation assay could thus help identify a subset of patients with poorer prognosis who could derive benefit from therapies targeting YAP, for instance by impairing the interaction of YAP with its transcriptional partners (e.g., TEAD 1–4 proteins). Our results, obtained in this homogeneous large series of MPM patients, all treated in a large phase 3 trial, confirm that targeting YAP in MPM represents a new and attractive therapeutic intervention in this disease, by targeting the actual features of MPM aggressiveness, responsible for unsatisfactory survival even under modern triplet regimens such as that used in the experimental arm of the MAPS trial, associating chemotherapy with the anti-angiogenesis drug bevacizumab.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the CMABio3 platform and Dr. N. Richard of the Department of Genetics of the University Hospital of Caen for the molecular characterisation of the mesothelial cell line used in this work. The Bio-MAPS study was sponsored by the *Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique* (IFCT), funded by an unrestricted research grant from ROCHE-France, research grants from ROCHE-France (2013) and from the *Fond de Recherche en Santé Respiratoire* (FRSR, 2012) to G.L., a research grant "APRI" from Caen University Hospital for S.B. (2014), and a research grant from the Normandie League against cancer for G.Z. (2012).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.L. and G.Z. conceived and designed the experiments. G.L., E.M., and S.B. performed experiments. V.H. provided technical assistance for in vivo experiments. C.D. validated the MPM diagnostic of each patient from the MAPS trial. E.B., A.S., J.M., J.M., L.G., C.A.-V., D.M.-S., O.M., R.M., I.M., and V.G. participated to sample collection. A.L. and F.M. performed data collection. A.L., F.M. and C.C. performed data analysis. G.L., G.Z., A.L., and C.C. performed data interpretation. E.M., G.L. and G.Z. wrote the manuscript with the help of all the authors. All authors approved the final manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0379-8>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Data availability: All data are stored at the IFCT centre and can be made available upon request.

Ethics approval and consent to participate: Specific informed consent was obtained for the biological studies (Bio-MAPS), and the trial was approved by the appropriate ethics committee (CPP Ref 2007-20 Nord-Ouest III, France).

Note: This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

REFERENCES

1. Wagner, J. C., Sleggs, C. A. & Marchand, P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br. J. Ind. Med.* **17**, 260–271 (1960).

2. Zalcman, G. et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* **387**, 1405–1414 (2016).
3. Bueno, R. et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat. Genet.* **48**, 407–416 (2016).
4. Meng, Z., Moroiishi, T. & Guan, K.-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* **30**, 1–17 (2016).
5. Qin, F., Tian, J., Zhou, D. & Chen, L. Mst1 and Mst2 kinases: regulations and diseases. *Cell Biosci.* **3**, 31 (2013).
6. Bitra, A., Sistla, S., Mariam, J., Malvi, H. & Anand, R. Rassf proteins as modulators of Mst1 kinase activity. *Sci. Rep.* **7**, 45020 (2017).
7. Guo, C., Zhang, X. & Pfeifer, G. P. The tumour suppressor RASSF1A prevents dephosphorylation of the mammalian STE20-like kinases MST1 and MST2. *J. Biol. Chem.* **286**, 6253–6261 (2011).
8. Servas, C. et al. The mammalian STE20-like kinase 1 (MST1) is a substrate for the apoptosis inhibiting protein kinase CK2. *Cell. Signal.* **36**, 163–175 (2017).
9. Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K. & Mizuno, K. MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Curr. Biol.* **19**, 675–681 (2009).
10. Guo, C. et al. RASSF1A is part of a complex similar to the *Drosophila* Hippo/Salvador/Lats tumour-suppressor network. *Curr. Biol.* **17**, 700–705 (2007).
11. Hergovich, A. et al. The MST1 and hMOB1 tumour suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Curr. Biol.* **19**, 1692–1702 (2009).
12. Praskova, M., Xia, F. & Avruch, J. MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation. *Curr. Biol.* **18**, 311–321 (2008).
13. Robertson, A. et al. Genetic ablation of the mammalian sterile-20 like kinase 1 (Mst1) improves cell reprogramming efficiency and increases induced pluripotent stem cell proliferation and survival. *Stem Cell Res.* **20**, 42–49 (2017).
14. Katagiri, K. et al. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. *EMBO J.* **28**, 1319–1331 (2009).
15. Liang, Y. et al. Long-term in vivo single-cell tracking reveals the switch of migration patterns in adult-born juxtaglomerular cells of the mouse olfactory bulb. *Cell Res.* **26**, 805–821 (2016).
16. Xu, X. et al. Mst1 kinase regulates the actin-bundling protein L-plastin to promote T cell migration. *J. Immunol.* **197**, 1683–1691 (2016).
17. Fischer, J. R. et al. Promoter methylation of RASSF1A, RARBeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer* **54**, 109–116 (2006).
18. Toyooka, S. et al. Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene* **21**, 4340–4344 (2002).
19. de Fraipont, F. et al. An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin. Cancer Res.* **18**, 2976–2986 (2012).
20. Seidel, C. et al. Frequent hypermethylation of MST1 and MST2 in soft tissue sarcoma. *Mol. Carcinog.* **46**, 865–871 (2007).
21. Levallet, G. et al. Plasma cell membrane localization of c-MET predicts longer survival in patients with malignant mesothelioma: a series of 157 cases from the MESOPATH Group. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 599–606 (2012).
22. Dubois, F. et al. RASSF1A suppresses the invasion and metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells by inhibiting YAP activation through the GEF-H1/RhoB pathway. *Cancer Res.* **76**, 1627–1640 (2016).
23. Miyayama, A. et al. Hippo pathway gene mutations in malignant mesothelioma: revealed by RNA and targeted exon sequencing. *J. Thorac. Oncol.* **10**, 844–851 (2015).
24. Woodard, G. A., Yang, Y.-L., You, L. & Jablons, D. M. Drug development against the hippo pathway in mesothelioma. *Transl. Lung Cancer Res.* **6**, 335–342 (2017).
25. Steinmann, K., Sandner, A., Schagdarsurengin, U. & Dammann, R. H. Frequent promoter hypermethylation of tumour-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **22**, 1519–1526 (2009).
26. Fukuhara, T. et al. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **463**, 968–974 (2015).
27. Sekido, Y. Inactivation of Merlin in malignant mesothelioma cells and the Hippo signaling cascade dysregulation: Merlin inactivation in mesothelioma. *Pathol. Int.* **61**, 331–344 (2011).
28. Tranchant, R. et al. Co-occurring mutations of tumour suppressor genes, LATS2 and NF2, in malignant pleural mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* **23**, 3191–3202 (2017).
29. Lin, X. et al. Prognostic significance of mammalian sterile 20-like kinase 1 in breast cancer. *Tumour Biol.* **34**, 3239–3243 (2013).
30. Sohn, B. H. et al. Inactivation of Hippo pathway is significantly associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **22**, 1256–1264 (2016).

31. Yu, J. Identification of MST1 as a potential early detection biomarker for colorectal cancer through a proteomic approach. *Sci. Rep.* **7**, 14265 (2017).
32. Attarha, S., Andersson, S., Mints, M. & Souchelnytskyi, S. Mammalian sterile-like 1 kinase inhibits TGF β and EGF-dependent regulation of invasiveness, migration and proliferation of HEC-1-A endometrial cancer cells. *Int. J. Oncol.* **45**, 853–860 (2014).
33. Fallahi, E., O'Driscoll, N. & Matalanas, D. The MST1/Hippo pathway and cell death: a non-canonical affair. *Genes* **7**, 28 (2016).
34. Galan, J. A. & Avruch, J. MST1/MST2 protein kinases: regulation and physiologic roles. *Biochemistry* **55**, 5507–5519 (2016).
35. Oh, H. J. et al. Role of the tumour suppressor RASSF1A in Mst1-mediated apoptosis. *Cancer Res.* **66**, 2562–2569 (2006).
36. Xu, C., Liu, C., Huang, W., Tu, S. & Wan, F. Effect of Mst1 overexpression on the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and the sensitivity to cisplatin in vitro. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **45**, 268–279 (2013).
37. Xu, C. M. et al. Mst1 overexpression inhibited the growth of human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* **20**, 453–460 (2013).
38. Zhang, W.-Q. et al. Targeting YAP in malignant pleural mesothelioma. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 2663–2676 (2017).
39. Wang, C. et al. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 27–37 (2015).



**COMITE D'EVALUATION
DES PROTOCOLES DE RECHERCHE
OBSERVATIONNELLE**

Dr BROSSEAU Solenn
Service d'Oncologie Thoracique
Hôpital Bichat
16 rue Henri Huchard,
75018 PARIS

solenn.brosseau@aphp.fr

Paris le 25 Août 2020

CEPRO

Coordinateur
Bruno CRESTANI

Comité
Fabrice BARLESI
Philippe DEVILLIER
Muriel FARTOUKH
Nelly FROSSARD
Dominique ISRAEL BIET
Isabelle PIN

Consultante
Elisabeth ORVOEN-FRIJA

Référence : CEPRO 2020-051

Cher Collègue,

Le projet « **“Lung cancer-on chip à partir de prélèvements tumoraux frais humains”** » a été examiné par le CEPRO de la SPLF.

Le comité considère que ce projet ne pose pas de problème d'ordre éthique, et estime qu'il entre effectivement dans le cadre observationnel.

Il rappelle cependant que le présent avis ne dégage en aucun cas les investigateurs de leurs responsabilités légales, qu'il s'agisse de la nécessité ou non de soumission à un Comité de Protection des Personnes, ou bien du respect de la législation concernant la mise en oeuvre d'un traitement de données à caractère personnel qui peut nécessiter l'avis du Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en Matière de Recherche dans le Domaine de la Santé (CCTIRS).

Les investigateurs peuvent faire état de l'avis du CEPRO lors de la soumission pour publication d'articles dérivés de ce travail (pour une publication en langue anglaise, utiliser la formulation *Institutional Review Board of the French learned society for respiratory medicine -Société de Pneumologie de Langue Française-*).

Cordialement.

Professeur Bruno CRESTANI
Pour le C.E.P.R.O

66 boulevard Saint Michel
75006 PARIS
01 46 34 03 87
cepro@splf.org

1. Dubois F, Keller M, Calvayrac O, Soncin F, Hoa L, Hergovich A, et al. RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. *Cancer Res.* 2016;76(6):1627-40.
2. Lin L, Sabnis AJ, Chan E, Olivas V, Cade L, Pazarentzos E, et al. The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat Genet.* 2015;47(3):250-6.
3. Maille E, Brosseau S, Hanoux V, Creveuil C, Danel C, Bergot E, et al. MST1/Hippo promoter gene methylation predicts poor survival in patients with malignant pleural mesothelioma in the IFCT-GFPC-0701 MAPS Phase 3 trial. *Br J Cancer.* 2019;120(4):387-97.
4. Sontheimer-Phelps A, Hassell BA, Ingber DE. Modelling cancer in microfluidic human organs-on-chips. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(2):65-81.
5. Portillo-Lara R, Annabi N. Microengineered cancer-on-a-chip platforms to study the metastatic microenvironment. *Lab Chip.* 2016;16(21):4063-81.
6. Nguyen M, De Ninno A, Mencattini A, Mermet-Meillon F, Fornabaio G, Evans SS, et al. Dissecting Effects of Anti-cancer Drugs and Cancer-Associated Fibroblasts by On-Chip Reconstitution of Immunocompetent Tumor Microenvironments. *Cell Rep.* 2018;25(13):3884-3893.e3.
7. Veith I, Mencattini A, Picant V, Serra M, Leclerc M, Comes MC, et al. Apoptosis mapping in space and time of 3D tumor ecosystems reveals transmissibility of cytotoxic cancer death. *PLoS Comput Biol.* 2021;17(3):e1008870.
8. Global Cancer Observatory [Internet]. [cité 5 oct 2022]. Disponible sur: <https://gco.iarc.fr/>
9. Cancer bronchique non à petites cellules - Référentiel national de RCP - Ref : RECOKBRNONPETCEL15 [Internet]. 2022. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Cancer-bronchique-non-a-petites-cellules-Referentiel-national-de-RCP>
10. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7-30.
11. Dietel M, Bubendorf L, Dingemans AMC, Dooms C, Elmberger G, García RC, et al. Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax.* 2016;71(2):177-84.
12. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J, Rami-Porta R, Asamura H, Eberhardt WEE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2016;11(1):39-51.
13. Nicholson AG, Tsao MS, Beasley MB, Borczuk AC, Brambilla E, Cooper WA, et al. The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2022;17(3):362-87.
14. Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohe C, Majem M, et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2020;383(18):1711-23.
15. Felip E, Altorki N, Zhou C, Csösz T, Vynnychenko I, Goloborodko O, et al. Adjuvant atezolizumab after adjuvant chemotherapy in resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (IMpower010): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl.* 2021;398(10308):1344-57.

16. AURA – Référentiels en oncologie thoracique [Internet]. [2022]. Disponible sur: <http://referentiels-aristot.com/>
17. Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ*. 2000;321(7257):323-9.
18. Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability [Internet]. [c 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>
19. Pirie K, Peto R, Reeves GK, Green J, Beral V, Million Women Study Collaborators. The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: a prospective study of one million women in the UK. *Lancet Lond Engl*. 2013;381(9861):133-41.
20. Zang EA, Wynder EL. Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(3-4):183-92.
21. Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ*. 1997;315(7114):980-8.
22. Callaghan RC, Allebeck P, Sidorchuk A. Marijuana use and risk of lung cancer: a 40-year cohort study. *Cancer Causes Control CCC*. 2013;24(10):1811-20.
23. Marant Micallef C, Shield KD, Baldi I, Charbotel B, Fervers B, Gilg Soit Ilg A, et al. Occupational exposures and cancer: a review of agents and relative risk estimates. *Occup Environ Med*. 2018;75(8):604-14.
24. Marant Micallef C, Shield KD, Vignat J, Baldi I, Charbotel B, Fervers B, et al. Cancers in France in 2015 attributable to occupational exposures. *Int J Hyg Environ Health*. 2019;222(1):22-9.
25. Lipsett M, Campleman S. Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: a meta-analysis. *Am J Public Health*. 1999;89(7):1009-17.
26. Gourd E. New evidence that air pollution contributes substantially to lung cancer. *Lancet Oncol*. 2022;23(10):e448.
27. Taioli E, Wynder EL. Re: Endocrine factors and adenocarcinoma of the lung in women. *J Natl Cancer Inst*. 1994;86(11):869-70.
28. Scott HR, McMillan DC, Forrest LM, Brown DJF, McArdle CS, Milroy R. The systemic inflammatory response, weight loss, performance status and survival in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2002;87(3):264-7.
29. Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, West H. Biomarker Testing for Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: Real-World Issues and Tough Choices. *Am Soc Clin Oncol Educ Book Am Soc Clin Oncol Annu Meet*. 2019;39:531-42.
30. Borghaei H, Gettinger S, Vokes EE, Chow LQM, Burgio MA, de Castro Carpeno J, et al. Five-Year Outcomes From the Randomized, Phase III Trials CheckMate 017 and 057: Nivolumab Versus Docetaxel in Previously Treated Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*. 2021;39(7):723-33.
31. Altorki NK, Yip R, Hanaoka T, Bauer T, Aye R, Kohman L, et al. Sublobar resection is equivalent to lobectomy for clinical stage 1A lung cancer in solid nodules. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147(2):754-62; Discussion 762-764.
32. Tosi D, Nosotti M, Bonitta G, Mendogni P, Bertolaccini L, Spaggiari L, et al. Anatomical segmentectomy versus pulmonary lobectomy for stage I non-small-cell lung cancer: patients selection and outcomes from the European Society of Thoracic Surgeons database analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2021;32(4):546-51.
33. Wang G, Lu X, Dey P, Deng P, Wu CC, Jiang S, et al. Targeting YAP-Dependent MDSC Infiltration Impairs Tumor Progression. *Cancer Discov*. 2016;6(1):80-95.
34. Spaggiari L, Sedda G, Maisonneuve P, Tessitore A, Casiraghi M, Petrella F, et al. A Brief Report on Survival After Robotic Lobectomy for Early-Stage Lung Cancer. *J Thorac*

- Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2019;14(12):2176-80.
35. Aiolfi A, Nosotti M, Micheletto G, Khor D, Bonitta G, Perali C, et al. Pulmonary lobectomy for cancer: Systematic review and network meta-analysis comparing open, video-assisted thoracic surgery, and robotic approach. *Surgery*. 2021;169(2):436-46.
 36. Forde PM, Spicer J, Lu S, Provencio M, Mitsudomi T, Awad MM, et al. Neoadjuvant Nivolumab plus Chemotherapy in Resectable Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2022;386(21):1973-85.
 37. Le Pechoux C, Pourel N, Barlesi F, Lerouge D, Antoni D, Lamezec B, et al. Postoperative radiotherapy versus no postoperative radiotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer and proven mediastinal N2 involvement (Lung ART): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2022;23(1):104-14.
 38. Antonia SJ, Villegas A, Daniel D, Vicente D, Murakami S, Hui R, et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N Engl J Med*. 2018;379(24):2342-50.
 39. Spigel DR, Faivre-Finn C, Gray JE, Vicente D, Planchard D, Paz-Ares L, et al. Five-Year Survival Outcomes From the PACIFIC Trial: Durvalumab After Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2022;40(12):1301-11.
 40. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy for Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer With PD-L1 Tumor Proportion Score ≥ 50 . *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2021;39(21):2339-49.
 41. de Castro G, Kudaba I, Wu YL, Lopes G, Kowalski DM, Turna HZ, et al. Five-Year Outcomes With Pembrolizumab Versus Chemotherapy as First-Line Therapy in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer and Programmed Death Ligand-1 Tumor Proportion Score $\geq 1\%$ in the KEYNOTE-042 Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2022;JCO2102885.
 42. JNCCN 360 - NSCLC - WCLC 2020: Pembrolizumab Plus Chemotherapy for Metastatic NSCLC [Internet]. [2022]. Disponible sur: <https://jnccn360.org/nsclc/news/wclc-2020-pembrolizumab-plus-chemotherapy-for-metastatic-nsclc/>
 43. First-Line Pembrolizumab Plus Chemotherapy for Patients With Advanced Squamous NSCLC: 3-Year Follow-up From KEYNOTE-407 | OncologyPRO [Internet]. [2022]. Disponible sur: <https://oncologypro.esmo.org/meeting-resources/european-lung-cancer-congress-2021/first-line-pembrolizumab-plus-chemotherapy-for-patients-with-advanced-squamous-nsclc-3-year-follow-up-from-keynote-407>
 44. Brahmer JR, Lee JS, Ciuleanu TE, Bernabe Caro R, Nishio M, Urban L, et al. Five-year survival outcomes with nivolumab (NIVO) plus ipilimumab (IPI) versus chemotherapy (chemo) as first-line (1L) treatment for metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): Results from CheckMate 227. *J Clin Oncol*. 2022;40(17_suppl):LBA9025-LBA9025.
 45. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(19):1823-33.
 46. Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2019;393(10183):1819-30.
 47. Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(22):2078-92.
 48. Paz-Ares L, Ciuleanu TE, Cobo M, Schenker M, Zurawski B, Menezes J, et al. First-

- line nivolumab plus ipilimumab combined with two cycles of chemotherapy in patients with non-small-cell lung cancer (CheckMate 9LA): an international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2021;22(2):198-211.
49. Ramalingam SS, Vansteenkiste J, Planchard D, Cho BC, Gray JE, Ohe Y, et al. Overall Survival with Osimertinib in Untreated, EGFR-Mutated Advanced NSCLC. *N Engl J Med.* 2020;382(1):41-50.
 50. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim DW, et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2017;377(9):829-38.
 51. Mok T, Camidge DR, Gadgeel SM, Rosell R, Dziadziuszko R, Kim DW, et al. Updated overall survival and final progression-free survival data for patients with treatment-naive advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer in the ALEX study. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2020;31(8):1056-64.
 52. Camidge DR, Kim HR, Ahn MJ, Yang JCH, Han JY, Lee JS, et al. Brigatinib versus Crizotinib in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2018;379(21):2027-39.
 53. Solomon BJ, Besse B, Bauer TM, Felip E, Soo RA, Camidge DR, et al. Lorlatinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from a global phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2018;19(12):1654-67.
 54. Mazières J, Zalcman G, Crinò L, Biondani P, Barlesi F, Filleron T, et al. Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2015;33(9):992-9.
 55. Planchard D, Smit EF, Groen HJM, Mazières J, Besse B, Helland Å, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1307-16.
 56. Levallet G, Bergot E, Antoine M, Creveuil C, Santos AO, Beau-Faller M, et al. High TUBB3 Expression, an Independent Prognostic Marker in Patients with Early Non-Small Cell Lung Cancer Treated by Preoperative Chemotherapy, Is Regulated by K-Ras Signaling Pathway. *Mol Cancer Ther.* 2012;11(5):1203-13.
 57. Justice RW, Zilian O, Woods DF, Noll M, Bryant PJ. 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.* 1995;9(5):534-46.
 58. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(1):63-79.
 59. Avruch J, Zhou D, Fitamant J, Bardeesy N, Mou F, Barrufet LR. Protein kinases of the Hippo pathway: regulation and substrates. *Semin Cell Dev Biol.* sept 2012;23(7):770-84.
 60. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan KL. The Hippo-YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev.* 2010;24(9):862-74.
 61. Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell.* 2009;16(5):425-38.
 62. Steinhardt AA, Gayyed MF, Klein AP, Dong J, Maitra A, Pan D, et al. Expression of Yes-associated protein in common solid tumors. *Hum Pathol.* 2008;39(11):1582-9.
 63. Xu MZ, Yao TJ, Lee NPY, Ng IOL, Chan YT, Zender L, et al. Yes-associated protein is an independent prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Cancer.* 2009;115(19):4576-85.
 64. Huang J, Wu S, Barrera J, Matthews K, Pan D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell.* 2005;122(3):421-34.

65. Moroishi T, Park HW, Qin B, Chen Q, Meng Z, Plouffe SW, et al. A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev.* 2015;29(12):1271-84.
66. Basu S, Totty NF, Irwin MS, Sudol M, Downward J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 2003;11(1):11-23.
67. Hilman D, Gat U. The evolutionary history of YAP and the hippo/YAP pathway. *Mol Biol Evol.* 2011;28(8):2403-17.
68. Donniger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci.* 15 2007;120(Pt 18):3163-72.
69. Bae SJ, Luo X. Activation mechanisms of the Hippo kinase signaling cascade. *Biosci Rep.* 2018;38(4):BSR20171469.
70. Sudol M, Bork P, Einbond A, Kastury K, Druck T, Negrini M, et al. Characterization of the mammalian YAP (Yes-associated protein) gene and its role in defining a novel protein module, the WW domain. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14733-41.
71. Kanai F, Marignani PA, Sarbassova D, Yagi R, Hall RA, Donowitz M, et al. TAZ: a novel transcriptional co-activator regulated by interactions with 14-3-3 and PDZ domain proteins. *EMBO J.* 2000;19(24):6778-91.
72. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev.* 2014;94(4):1287-312.
73. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 2007;21(21):2747-61.
74. Morin-Kensicki EM, Boone BN, Howell M, Stonebraker JR, Teed J, Alb JG, et al. Defects in yolk sac vasculogenesis, chorioallantoic fusion, and embryonic axis elongation in mice with targeted disruption of Yap65. *Mol Cell Biol.* 2006;26(1):77-87.
75. Sawada A, Kiyonari H, Ukita K, Nishioka N, Imuta Y, Sasaki H. Redundant roles of Tead1 and Tead2 in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival. *Mol Cell Biol.* 2008;28(10):3177-89.
76. Makita R, Uchijima Y, Nishiyama K, Amano T, Chen Q, Takeuchi T, et al. Multiple renal cysts, urinary concentration defects, and pulmonary emphysematous changes in mice lacking TAZ. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(3):F542-553.
77. Nishioka N, Inoue K ichi, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, et al. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophoderm from inner cell mass. *Dev Cell.* 2009;16(3):398-410.
78. Mahoney JE, Mori M, Szymaniak AD, Varelas X, Cardoso WV. The hippo pathway effector Yap controls patterning and differentiation of airway epithelial progenitors. *Dev Cell.* 2014;30(2):137-50.
79. Szymaniak AD, Mahoney JE, Cardoso WV, Varelas X. Crumbs3-Mediated Polarity Directs Airway Epithelial Cell Fate through the Hippo Pathway Effector Yap. *Dev Cell.* 2015;34(3):283-96.
80. Isago H, Mitani A, Mikami Y, Horie M, Urushiyama H, Hamamoto R, et al. Epithelial Expression of YAP and TAZ Is Sequentially Required in Lung Development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2020;62(2):256-66.
81. Mauviel A, Nallet-Staub F, Varelas X. Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene.* 2012;31(14):1743-56.
82. Couzens AL, Knight JDR, Kean MJ, Teo G, Weiss A, Dunham WH, et al. Protein interaction network of the mammalian Hippo pathway reveals mechanisms of kinase-phosphatase interactions. *Sci Signal.* 2013;6(302):rs15.
83. Vassilev A, Kaneko KJ, Shu H, Zhao Y, DePamphilis ML. TEAD/TEF transcription

- factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* 2001;15(10):1229-41.
84. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* 2008;22(14):1962-71.
 85. Krupska I, Bruford EA, Chaqour B. Eyeing the Cyr61/CTGF/NOV (CCN) group of genes in development and diseases: highlights of their structural likenesses and functional dissimilarities. *Hum Genomics.* 2015;9:24.
 86. Zanconato F, Forcato M, Battilana G, Azzolin L, Quaranta E, Bodega B, et al. Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat Cell Biol.* 2015;17(9):1218-27.
 87. Lian I, Kim J, Okazawa H, Zhao J, Zhao B, Yu J, et al. The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* 2010;24(11):1106-18.
 88. Ma S, Meng Z, Chen R, Guan KL. The Hippo Pathway: Biology and Pathophysiology. *Annu Rev Biochem.* 2019;88:577-604.
 89. Varelas X, Samavarchi-Tehrani P, Narimatsu M, Weiss A, Cockburn K, Larsen BG, et al. The Crumbs complex couples cell density sensing to Hippo-dependent control of the TGF- β -SMAD pathway. *Dev Cell.* 2010;19(6):831-44.
 90. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature.* 2011;474(7350):179-83.
 91. Aragona M, Panciera T, Manfrin A, Giulitti S, Michielin F, Elvassore N, et al. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell.* 2013;154(5):1047-59.
 92. Guo C, Tommasi S, Liu L, Yee JK, Dammann R, Pfeifer GP. RASSF1A is part of a complex similar to the *Drosophila* Hippo/Salvador/Lats tumor-suppressor network. *Curr Biol CB.* 2007;17(8):700-5.
 93. Tan G, Cao X, Dai Q, Zhang B, Huang J, Xiong S, et al. A novel role for microRNA-129-5p in inhibiting ovarian cancer cell proliferation and survival via direct suppression of transcriptional co-activators YAP and TAZ. *Oncotarget.* 2015;6(11):8676-86.
 94. Hua K, Jin J, Zhao J, Song J, Song H, Li D, et al. miR-135b, upregulated in breast cancer, promotes cell growth and disrupts the cell cycle by regulating LATS2. *Int J Oncol.* 2016;48(5):1997-2006.
 95. Xin Y, Yang X, Xiao J, Zhao W, Li Y, Lu L, et al. MiR-135b promotes HCC tumorigenesis through a positive-feedback loop. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;530(1):259-65.
 96. Chen M, Wang M, Xu S, Guo X, Jiang J. Upregulation of miR-181c contributes to chemoresistance in pancreatic cancer by inactivating the Hippo signaling pathway. *Oncotarget.* 2015;6(42):44466-79.
 97. Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(4):211-26.
 98. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell.* 2016;29(6):783-803.
 99. Bhat KPL, Salazar KL, Balasubramanian V, Wani K, Heathcock L, Hollingsworth F, et al. The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes Dev.* 2011;25(24):2594-609.
 100. Díaz-Martín J, López-García MÁ, Romero-Pérez L, Atienza-Amores MR, Pecero ML, Castilla MÁ, et al. Nuclear TAZ expression associates with the triple-negative phenotype in breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2015;22(3):443-54.
 101. Wang Y, Dong Q, Zhang Q, Li Z, Wang E, Qiu X. Overexpression of yes-associated protein contributes to progression and poor prognosis of non-small-cell lung cancer. *Cancer*

Sci. 2010;101(5):1279-85.

102. Lau AN, Curtis SJ, Fillmore CM, Rowbotham SP, Mohseni M, Wagner DE, et al. Tumor-propagating cells and Yap/Taz activity contribute to lung tumor progression and metastasis. *EMBO J.* 2014;33(5):468-81.
103. Cheng H, Zhang Z, Rodriguez-Barrueco R, Borczuk A, Liu H, Yu J, et al. Functional genomics screen identifies YAP1 as a key determinant to enhance treatment sensitivity in lung cancer cells. *Oncotarget.* 2016;7(20):28976-88.
104. Noguchi S, Saito A, Horie M, Mikami Y, Suzuki HI, Morishita Y, et al. An integrative analysis of the tumorigenic role of TAZ in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2014;20(17):4660-72.
105. Xie M, Zhang L, He CS, Hou JH, Lin SX, Hu ZH, et al. Prognostic significance of TAZ expression in resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* 2012;7(5):799-807.
106. Su L li, Ma W xia, Yuan J feng, Shao Y, Xiao W, Jiang S juan. Expression of Yes-associated protein in non-small cell lung cancer and its relationship with clinical pathological factors. *Chin Med J (Engl).* 2012;125(22):4003-8.
107. Mohseni M, Sun J, Lau A, Curtis S, Goldsmith J, Fox VL, et al. A genetic screen identifies an LKB1-MARK signalling axis controlling the Hippo-YAP pathway. *Nat Cell Biol.* 2014;16(1):108-17.
108. Zhang W, Gao Y, Li F, Tong X, Ren Y, Han X, et al. YAP promotes malignant progression of Lkb1-deficient lung adenocarcinoma through downstream regulation of survivin. *Cancer Res.* 2015;75(21):4450-7.
109. Sato M, Larsen JE, Lee W, Sun H, Shames DS, Dalvi MP, et al. Human lung epithelial cells progressed to malignancy through specific oncogenic manipulations. *Mol Cancer Res MCR.* 2013;11(6):638-50.
110. Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, Dive C, Dowlati A, George J, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(5):289-97.
111. McColl K, Wildey G, Sakre N, Lipka MB, Behtaj M, Kresak A, et al. Reciprocal expression of INSM1 and YAP1 defines subgroups in small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2017;8(43):73745-56.
112. ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature.* 2020;578(7793):82-93.
113. Gay CM, Stewart CA, Park EM, Diao L, Groves SM, Heeke S, et al. Patterns of transcription factor programs and immune pathway activation define four major subtypes of SCLC with distinct therapeutic vulnerabilities. *Cancer Cell.* 2021;39(3):346-360.e7.
114. Ireland AS, Micinski AM, Kastner DW, Guo B, Wait SJ, Spainhower KB, et al. MYC Drives Temporal Evolution of Small Cell Lung Cancer Subtypes by Reprogramming Neuroendocrine Fate. *Cancer Cell.* 2020;38(1):60-78.e12.
115. Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell.* 2007;130(6):1120-33.
116. Kapoor A, Yao W, Ying H, Hua S, Liewen A, Wang Q, et al. Yap1 Activation Enables Bypass of Oncogenic Kras Addiction in Pancreatic Cancer. *Cell.* 2014;158(1):185-97.
117. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, et al. YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Curr Biol.* 2007;17(23):2054-60.
118. Zhao B, Li L, Wang L, Wang CY, Yu J, Guan KL. Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 2012;26(1):54-68.

119. Jin L, Chen Y, Cheng D, He Z, Shi X, Du B, et al. YAP inhibits autophagy and promotes progression of colorectal cancer via upregulating Bcl-2 expression. *Cell Death Dis.* 2021;12(5):457.
120. Vigneron AM, Ludwig RL, Vousden KH. Cytoplasmic ASPP1 inhibits apoptosis through the control of YAP. *Genes Dev.* 2010;24(21):2430-9.
121. Bartucci M, Dattilo R, Moriconi C, Pagliuca A, Mottolese M, Federici G, et al. TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2015;34(6):681-90.
122. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, Forcato M, Rosato A, Frasson C, et al. The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells. *Cell.* 2011;147(4):759-72.
123. Kim DK, Kim EK, Jung DW, Kim J. Cytoskeletal alteration modulates cancer cell invasion through RhoA-YAP signaling in stromal fibroblasts. *PloS One.* 2019;14(3):e0214553.
124. Calvo F, Ege N, Grande-Garcia A, Hooper S, Jenkins RP, Chaudhry SI, et al. Mechanotransduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2013;15(6):637-46.
125. Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(9):591-600.
126. Lo Sardo F, Strano S, Blandino G. YAP and TAZ in Lung Cancer: Oncogenic Role and Clinical Targeting. *Cancers.* 2018;10(5):137.
127. Mo JS, Park HW, Guan KL. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep.* 2014;15(6):642-56.
128. Zhu C, Li L, Zhao B. The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2015;47(1):16-28.
129. Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet.* 2016;48(4):407-16.
130. Striedinger K, VandenBerg SR, Baia GS, McDermott MW, Gutmann DH, Lal A. The neurofibromatosis 2 tumor suppressor gene product, merlin, regulates human meningioma cell growth by signaling through YAP. *Neoplasia N Y N.* 2008;10(11):1204-12.
131. Oh JE, Ohta T, Satomi K, Foll M, Durand G, McKay J, et al. Alterations in the NF2/LATS1/LATS2/YAP Pathway in Schwannomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(10):952-9.
132. Bianchi AB, Mitsunaga SI, Cheng JQ, Klein WM, Jhanwar SC, Seizinger B, et al. High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(24):10854-8.
133. Agathangelou A, Honorio S, Macartney DP, Martinez A, Dallol A, Rader J, et al. Methylation associated inactivation of RASSF1A from region 3p21.3 in lung, breast and ovarian tumours. *Oncogene.* 2001;20(12):1509-18.
134. Donniger H, Vos MD, Clark GJ. The RASSF1A tumor suppressor. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 18):3163-72.
135. Volodko N, Salla M, Zare A, Abulghasem EA, Vincent K, Benesch MGK, et al. RASSF1A Site-Specific Methylation Hotspots in Cancer and Correlation with RASSF1C and MOAP-1. *Cancers.* 2016;8(6):55.
136. Vlahov N, Scrace S, Soto MS, Grawenda AM, Bradley L, Pankova D, et al. Alternate RASSF1 Transcripts Control SRC Activity, E-Cadherin Contacts, and YAP-Mediated Invasion. *Curr Biol CB.* 2015;25(23):3019-34.
137. de Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, et al.

- An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2012;18(10):2976-86.
138. Keller M, Dubois F, Teulier S, Martin APJ, Levallet J, Maille E, et al. NDR2 kinase contributes to cell invasion and cytokinesis defects induced by the inactivation of RASSF1A tumor-suppressor gene in lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2019;38(1):158.
139. Nguyen HB, Babcock JT, Wells CD, Quilliam LA. LKB1 tumor suppressor regulates AMP kinase/mTOR-independent cell growth and proliferation via the phosphorylation of Yap. *Oncogene.* 2013;32(35):4100-9.
140. Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature.* 2008;455(7216):1069-75.
141. Matsumoto S, Iwakawa R, Takahashi K, Kohno T, Nakanishi Y, Matsuno Y, et al. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene.* 2007;26(40):5911-8.
142. Malik SA, Khan MS, Dar M, Hussain MU, Shah MA, Shafi SM, et al. Molecular Alterations and Expression Dynamics of LATS1 and LATS2 Genes in Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Pathol Oncol Res POR.* 2018;24(2):207-14.
143. Nguyen CDK, Yi C. YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Trends Cancer.* 2019;5(5):283-96.
144. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, et al. Hematologic and Cytogenetic Responses to Imatinib Mesylate in Chronic Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med.* 2002;346(9):645-52.
145. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011;29(10):1239-46.
146. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJJE, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature.* 2014;508(7494):118-22.
147. Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science.* 2014;343(6166):84-7.
148. Hsu PC, You B, Yang YL, Zhang WQ, Wang YC, Xu Z, et al. YAP promotes erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 92016;7(32):51922-33.
149. Shao DD, Xue W, Krall EB, Bhutkar A, Piccioni F, Wang X, et al. KRAS and YAP1 converge to regulate EMT and tumor survival. *Cell.* 2014;158(1):171-84.
150. Kitajima S, Asahina H, Chen T, Guo S, Quiceno LG, Cavanaugh JD, et al. Overcoming Resistance to Dual Innate Immune and MEK Inhibition Downstream of KRAS. *Cancer Cell.* 2018;34(3):439-452.e6.
151. Chong CR, Jänne PA. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1389-400.
152. Pao W, Chmielecki J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(11):760-74.
153. Lai GGY, Lim TH, Lim J, Liew PJR, Kwang XL, Nahar R, et al. Clonal MET Amplification as a Determinant of Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2019;37(11):876-84.
154. Singh A, Settleman J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene.* 2010;29(34):4741-51.
155. Jänne PA, Gray N, Settleman J. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8(9):709-23.
156. Blakely CM, Watkins TBK, Wu W, Gini B, Chabon JJ, McCoach CE, et al.

- Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat Genet.* 2017;49(12):1693-704.
157. Lackner MR, Wilson TR, Settleman J. Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol Lond Engl.* 2012;8(8):999-1014.
158. Weng CH, Chen LY, Lin YC, Shih JY, Lin YC, Tseng RY, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI. *Oncogene.* 2019;38(4):455-68.
159. Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidias P, et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med.* 2011;3(75):75ra26.
160. Fan PD, Narzisi G, Jayaprakash AD, Venturini E, Robine N, Smibert P, et al. YES1 amplification is a mechanism of acquired resistance to EGFR inhibitors identified by transposon mutagenesis and clinical genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(26):E6030-8.
161. Mohamed Z, Hassan MK, Okasha S, Mitamura T, Keshk S, Konno Y, et al. miR-363 confers taxane resistance in ovarian cancer by targeting the Hippo pathway member, LATS2. *Oncotarget.* 2018;9(53):30053-65.
162. Yeung B, Khanal P, Mehta V, Trinkle-Mulcahy L, Yang X. Identification of Cdk1–LATS–Pin1 as a Novel Signaling Axis in Anti-tubulin Drug Response of Cancer Cells. *Mol Cancer Res.* 2018;16(6):1035-45.
163. Xia Y, Zhang YL, Yu C, Chang T, Fan HY. YAP/TEAD co-activator regulated pluripotency and chemoresistance in ovarian cancer initiated cells. *PloS One.* 2014;9(11):e109575.
164. Dai Y, Liu S, Zhang WQ, Yang YL, Hang P, Wang H, et al. YAP1 regulates ABCG2 and cancer cell side population in human lung cancer cells. *Oncotarget.* 2017;8(3):4096-109.
165. Yoshikawa K, Noguchi K, Nakano Y, Yamamura M, Takaoka K, Hashimoto-Tamaoki T, et al. The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2015;46(6):2364-70.
166. Song J, Xie LX, Zhang XY, Hu P, Long MF, Xiong F, et al. Role of YAP in lung cancer resistance to cisplatin. *Oncol Lett.* 2018;16(3):3949-54.
167. Lu T, Sun L, Zhu X. Yes-associated protein enhances proliferation and attenuates sensitivity to cisplatin in human gastric cancer cells. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 2018;105:1269-75.
168. Huo X, Zhang Q, Liu AM, Tang C, Gong Y, Bian J, et al. Overexpression of Yes-associated protein confers doxorubicin resistance in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2013;29(2):840-6.
169. Ren A, Yan G, You B, Sun J. Down-regulation of mammalian sterile 20-like kinase 1 by heat shock protein 70 mediates cisplatin resistance in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2008;68(7):2266-74.
170. Bi L, Ma F, Tian R, Zhou Y, Lan W, Song Q, et al. AJUBA increases the cisplatin resistance through hippo pathway in cervical cancer. *Gene.* 2018;644:148-54.
171. Sève P, Reiman T, Lai R, Hanson J, Santos C, Johnson L, et al. Class III beta-tubulin is a marker of paclitaxel resistance in carcinomas of unknown primary site. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007;60(1):27-34.
172. Sève P, Isaac S, Trédan O, Souquet PJ, Pachéco Y, Pérol M, et al. Expression of class III {beta}-tubulin is predictive of patient outcome in patients with non-small cell lung cancer receiving vinorelbine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2005;11(15):5481-6.
173. Miao J, Hsu PC, Yang YL, Xu Z, Dai Y, Wang Y, et al. YAP regulates PD-L1 expression in human NSCLC cells. *Oncotarget.* 2017;8(70):114576-87.

174. Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ. The immunosuppressive tumour network: myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and natural killer T cells. *Immunology*. 2013;138(2):105-15.
175. Sebio A, Lenz HJ. Molecular Pathways: Hippo Signaling, a Critical Tumor Suppressor. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015;21(22):5002-7.
176. Tang Z, Ma Q, Wang L, Liu C, Gao H, Yang Z, et al. A brief review: some compounds targeting YAP against malignancies. *Future Oncol Lond Engl*. 2019;15(13):1535-43.
177. Liu-Chittenden Y, Huang B, Shim JS, Chen Q, Lee SJ, Anders RA, et al. Genetic and pharmacological disruption of the TEAD–YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev*. 2012;26(12):1300-5.
178. Gibault F, Corvaisier M, Bailly F, Huet G, Melnyk P, Cotellet P. Non-Photoinduced Biological Properties of Verteporfin. *Curr Med Chem*. 2016;23(11):1171-84.
179. Brodowska K, Moujahed A, Marmalidou A, zu Horste MM, Cichy J, Miller JW, et al. The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth in vitro without light activation. *Exp Eye Res*. 2014;124:67-73.
180. Feng J, Gou J, Jia J, Yi T, Cui T, Li Z. Verteporfin, a suppressor of YAP-TEAD complex, presents promising antitumor properties on ovarian cancer. *OncoTargets Ther*. 2016;9:5371-81.
181. Jiao S, Wang H, Shi Z, Dong A, Zhang W, Song X, et al. A peptide mimicking VGLL4 function acts as a YAP antagonist therapy against gastric cancer. *Cancer Cell*. 2014;25(2):166-80.
182. Taccioli C, Sorrentino G, Zannini A, Caroli J, Beneventano D, Anderlucchi L, et al. MDP, a database linking drug response data to genomic information, identifies dasatinib and statins as a combinatorial strategy to inhibit YAP/TAZ in cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(36):38854-65.
183. Oku Y, Nishiya N, Shito T, Yamamoto R, Yamamoto Y, Oyama C, et al. Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers. *FEBS Open Bio*. 2015;5:542-9.
184. Sun J, Wang X, Tang B, Liu H, Zhang M, Wang Y, et al. A tightly controlled Src-YAP signaling axis determines therapeutic response to dasatinib in renal cell carcinoma. *Theranostics*. 2018;8(12):3256-67.
185. Montani D, Bergot E, Günther S, Savale L, Bergeron A, Bourdin A, et al. Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation*. 2012;125(17):2128-37.
186. Swamy MV, Patlolla JMR, Steele VE, Kopelovich L, Reddy BS, Rao CV. Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by low doses of atorvastatin and celecoxib given individually and in combination to APCMin mice. *Cancer Res*. 2006;66(14):7370-7.
187. Zhao W, Liu H, Wang J, Wang M, Shao R. Cyclizing-berberine A35 induces G2/M arrest and apoptosis by activating YAP phosphorylation (Ser127). *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2018;37(1):98.
188. Yin J, Dong Q, Zheng M, Xu X, Zou G, Ma G, et al. Antitumor activity of dobutamine on human osteosarcoma cells. *Oncol Lett*. 2016;11(6):3676-80.
189. Bao Y, Nakagawa K, Yang Z, Ikeda M, Withanage K, Ishigami-Yuasa M, et al. A cell-based assay to screen stimulators of the Hippo pathway reveals the inhibitory effect of dobutamine on the YAP-dependent gene transcription. *J Biochem (Tokyo)*. 2011;150(2):199-208.
190. Shimada H, Abe S, Kohno T, Satohisa S, Konno T, Takahashi S, et al. Loss of tricellular tight junction protein LSR promotes cell invasion and migration via upregulation of TEAD1/AREG in human endometrial cancer. *Sci Rep*. 2017;7:37049.

191. Cravo AS, Carter E, Erkan M, Harvey E, Furutani-Seiki M, Mrsny R. Hippo pathway elements Co-localize with Occludin: A possible sensor system in pancreatic epithelial cells. *Tissue Barriers*. 2015;3(3):e1037948.
192. Zanconato F, Battilana G, Forcato M, Filippi L, Azzolin L, Manfrin A, et al. Transcriptional addiction in cancer cells is mediated by YAP/TAZ through BRD4. *Nat Med*. 2018;24(10):1599-610.
193. Carol H, Boehm I, Reynolds CP, Kang MH, Maris JM, Morton CL, et al. Efficacy and pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of the Aurora kinase A inhibitor MLN8237 against preclinical models of pediatric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;68(5):1291-304.
194. Bum-Erdene K, Zhou D, Gonzalez-Gutierrez G, Ghosayel MK, Si Y, Xu D, et al. Small-Molecule Covalent Modification of Conserved Cysteine Leads to Allosteric Inhibition of the TEAD-Yap Protein-Protein Interaction. *Cell Chem Biol*. 2019;26(3):378-389.e13.
195. Chen L, Chan SW, Zhang X, Walsh M, Lim CJ, Hong W, et al. Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the hippo pathway. *Genes Dev*. 2010;24(3):290-300.
196. Fan M, Lu W, Che J, Kwiatkowski NP, Gao Y, Seo HS, et al. Covalent disruptor of YAP-TEAD association suppresses defective Hippo signaling. *eLife*. 2022;11:e78810.
197. Kaneda A, Seike T, Danjo T, Nakajima T, Otsubo N, Yamaguchi D, et al. The novel potent TEAD inhibitor, K-975, inhibits YAP1/TAZ-TEAD protein-protein interactions and exerts an anti-tumor effect on malignant pleural mesothelioma. *Am J Cancer Res*. 2020;10(12):4399-415.
198. Hsu PC, You B, Yang YL, Zhang WQ, Wang YC, Xu Z, et al. YAP promotes erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7(32):51922-33.
199. Wada KI, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Dev Camb Engl*. sept 2011;138(18):3907-14.
200. Stewart DJ. Wnt Signaling Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst [Internet]*. 2014;106(1). Disponible sur: <https://academic.oup.com/jnci/article/106/1/djt356/2518008>
201. Giroux Leprieur E, Vieira T, Antoine M, Rozensztajn N, Rabbe N, Ruppert AM, et al. Sonic Hedgehog Pathway Activation Is Associated With Resistance to Platinum-Based Chemotherapy in Advanced Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *Clin Lung Cancer*. 2016;17(4):301-8.
202. Wu Q, Guo J, Liu Y, Zheng Q, Li X, Wu C, et al. YAP drives fate conversion and chemoresistance of small cell lung cancer. *Sci Adv*. 2021;7(40):eabg1850.
203. Tian F, Schrödl K, Kiefl R, Huber RM, Bergner A. The hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 alters intracellular Ca²⁺ homeostasis and inhibits cell growth in cisplatin-resistant lung cancer cells. *Anticancer Res*. 2012;32(1):89-94.
204. Sims-Mourtada J, Izzo JG, Ajani J, Chao KSC. Sonic Hedgehog promotes multiple drug resistance by regulation of drug transport. *Oncogene*. 2007;26(38):5674-9.
205. Stewart DJ. Tumor and host factors that may limit efficacy of chemotherapy in non-small cell and small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. sept 2010;75(3):173-234.
206. Pearson JD, Huang K, Pacal M, McCurdy SR, Lu S, Aubry A, et al. Binary pan-cancer classes with distinct vulnerabilities defined by pro- or anti-cancer YAP/TEAD activity. *Cancer Cell*. 2021;39(8):1115-1134.e12.
207. Verfaillie A, Imrichova H, Atak ZK, Dewaele M, Rambow F, Hulselmans G, et al. Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat Commun*. 2015;6:6683.
208. Gu C, Huang Z, Chen X, Liu C, Rocco G, Zhao S, et al. TEAD4 promotes tumor development in patients with lung adenocarcinoma via ERK signaling pathway. *Biochim*

Biophys Acta Mol Basis Dis. 2020;1866(12):165921.

209. Oberkersch RE, Santoro MM. YAP/TAZ-TEAD link angiogenesis to nutrients. Nat Metab. juin 2022;4(6):645-6.