



HAL
open science

**Place de la signalisation Hippo dans l'histoire naturelle
du Mésothéliome Pleural Malin (MPM) : dissection de
ses rôles dans les lignées mésothéliales pleurales
humaines et application à la caractérisation moléculaire
des 448 patients atteints de MPM inclus dans l'essai
clinique de phase 3 "MAPS"**

Elodie Chevalier

► **To cite this version:**

Elodie Chevalier. Place de la signalisation Hippo dans l'histoire naturelle du Mésothéliome Pleural Malin (MPM) : dissection de ses rôles dans les lignées mésothéliales pleurales humaines et application à la caractérisation moléculaire des 448 patients atteints de MPM inclus dans l'essai clinique de phase 3 "MAPS". Biologie cellulaire. Normandie Université, 2018. Français. NNT : 2018NORMC405 . tel-02097491

HAL Id: tel-02097491

<https://theses.hal.science/tel-02097491>

Submitted on 12 Apr 2019

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

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



Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

Place de la signalisation Hippo dans l'histoire naturelle du Mésothéliome

Pleural Malin (MPM) : dissection de ses rôles dans des lignées mésothéliales pleurales humaines et application à la caractérisation moléculaire des 448 patients atteints de MPM inclus dans l'essai clinique de phase 3 « MAPS ».

**Présentée et soutenue par
Elodie Chevalier**

**Thèse soutenue publiquement le 27 mars 2018
devant le jury composé de**

Mme Guillemette HUET	Maître de conférences, HDR, Université de Lille	Rapporteur
Mr Didier JEAN	Chargé de recherche, HDR, Universités Paris-Descartes, Paris Diderot et Paris 13	Rapporteur
Mme Brigitte SOLA	Directrice de recherche, Université de Caen Normandie	Examineur
Mr Alexis CORTOT	Professeur des universités, Université de Lille	Examineur
Mme Guénaëlle LEVALLET	Maître de conférences, HDR, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse
Mr Gérard ZALCMAN	Professeur des universités, Université Paris Diderot (Paris 7)	Codirecteur de thèse

Thèse dirigée par Guénaëlle LEVALLET (Unité ISTCT FRE2001) et Gérard ZALCMAN (U830 INSERM "Génétique et biologie des cancers").



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



EdNBISE
Ecole doctorale Normande
Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Mesdames et Messieurs les membres du jury pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, je vous en suis sincèrement reconnaissante.

Je tiens à remercier mes rapporteurs de thèse, le Dr. Guillemette HUET et le Dr. Didier JEAN, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude au Dr. Brigitte SOLA au Pr. Alexis CORTOT, pour avoir tous deux accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, le Dr. Guénaëlle LEVALLET, pour son aide précieuse, ses conseils, sa disponibilité et son excellent encadrement. Je te remercie pour m'avoir permis d'intégrer ton équipe en Master 1 puis en Master 2 et enfin de m'avoir fait confiance pour poursuivre en thèse. Durant ces 5 années tu m'as toujours soutenu, motivé, guidé tout en me laissant une grande autonomie et j'ai ainsi appris énormément de choses à tes côtés. Un grand merci pour les corrections de ce manuscrit ainsi que ton soutien depuis le début de mon parcours, tu as su me remonter le moral et m'encourager pour que je ne lâche rien dans les moments de doutes et de stress de la fin de thèse.

Je tiens à témoigner de ma sincère reconnaissance et de ma grande considération à mon codirecteur de thèse, le Pr Gérard ZALCMAN, pour m'avoir accordé sa confiance pour intégrer son équipe de recherche en Master et permis de poursuivre en thèse. Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un Essai clinique de grande envergure avec un impact significatif sur la survie des patients atteints d'un MPM et de m'avoir confié l'analyse des prélèvements précieux des patients inclus dans cet essai, ce qui m'a permis d'allier à la fois la recherche clinique et plus fondamentale. Enfin, merci pour avoir pris le temps d'apporter vos corrections à ce manuscrit et soyez assuré de mon profond respect.

Je remercie la région Basse-Normandie et l'association des insuffisants respiratoires (AIR) de m'avoir financé et ainsi donné l'opportunité de mener à bien ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements au Pr. Guy LAUNOY, directeur du laboratoire ANTICIPE, ainsi qu'au Pr. Pierre-Jacques BONNAMY, directeur du laboratoire Œstrogène, Reproduction et Cancers (OeReCa) au moment de ma thèse, de m'avoir permis d'intégrer leurs unités pour réaliser ce travail durant les 27 premiers mois de cette thèse. Je tiens également à remercier le Dr. Myriam BERNAUDIN, pour m'avoir accueillie au sein de son unité ISTCT-Equipe Cervoxy-CYCERON, pour ma dernière année de thèse.

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire OeReCa pour leur accueil, leur gentillesse et les conseils qu'ils ont pu me donner. Je remercie tout particulièrement Laura HOULLIER et le Dr Jérôme LEVALLET, pour leur contribution sur la partie caractérisation de nos cinq lignées de MPM, au début de ce travail, cette collaboration a été d'un aide très précieuse.

Je tiens à remercier le Dr. Nicolas ELIE et le Dr. Didier GOUX du CMABIO, pour l'aide qu'ils m'ont apporté, notamment Nicolas pour m'avoir soutenu et conseillé pendant mes nombreuses séances de confocal en cette fin de thèse.

Merci à tous les membres de l'équipe Cervoxy, pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont accordé quand je suis arrivée après mon congé maternité, leur aide précieuse pour m'avoir montré le fonctionnement du laboratoire et répondu à mes nombreuses questions.

Un immense merci à tous les étudiants que j'ai rencontré au laboratoire OeReCa et CERVOXY, pour leurs conseils, bonne humeur et soutien, qui sont devenus pour la plus part de véritables amis sur lesquels j'ai pu compter pour me soutenir tout au long de mon parcours. Merci les filles pour les bons moments partagés autour d'une tasse de thé et pour avoir été présentes pendant de nombreux moments importants de ma vie. Merci à celles qui sont reparties avant la fin de ma thèse : Camille, Vanessa, Renata, Anne-charlotte...

Solenn ce fût un réel plaisir de t'encadrer pendant ton Master 2 au début de ma thèse, durant cette année passée avec toi, nous avons eu de nombreux fous-rires pendant nos journées IHC à la chaîne au CHU mais aussi nos longues séances de confocal.

Mention spéciale à Emmanuelle, nous avons commencé notre thèse en même temps, je te remercie pour ton amitié, tes conseils scientifiques et personnels, nos séances de zumba et piscine pour décompresser et je n'oublie pas ton soutien dans l'écriture de cette thèse, tu es une vraie amie sur qui je peux compter.

Maureen je tiens à te remercier pour ton aide et surtout ton soutien après ta soutenance, le temps que tu as pris pour me motiver et me booster au téléphone dans les périodes difficiles. On se comprend entre jeunes mamans en thèse, encore merci à toi.

Enfin un grand merci Fatemeh pour m'avoir formé sur de nombreuses techniques pendant mon stage de DUT et de Master où j'ai rencontré la personne la plus généreuse, adorable et souriante que je connaisse. Très vite nous sommes devenues de vraies amies, après une coupure de 2 ans de post-doc aux Etats-Unis où tu m'as terriblement manqué, tu es toujours là pour moi. Merci du fond du cœur pour ton soutien.

Je remercie tous mes amis pour tous les merveilleux moments passés ensemble, de leur écoute et patience lors de ces années de thèse.

Mille merci à ma famille, et en particulier mes parents pour leur encouragements ces derniers mois et les longues heures au téléphone pendant les moments difficiles. Merci pour avoir toujours cru en moi ce qui m'a permis de garder confiance et prendre de l'assurance et j'espère que vous êtes fière de mon parcours.

Enfin, un immense merci à l'amour de ma vie, Thibault, pour avoir été présent pour moi dans les bons comme les mauvais moments lors de ce travail de thèse et surtout d'avoir réussi à me supporter en période de stress notamment pendant les derniers mois de rédaction. Je sais que ce n'a pas été simple pour toi, tu as dû gérer énormément de choses en même temps.

Ces trois années sont celles où nous avons partagé les meilleurs moments de notre vie avec notre mariage, l'achat de notre maison et surtout la naissance de notre petite puce, Chloé.

Tu es une petite fille formidable du haut de tes un an (que le temps passe vite) et tu m'apporte tellement de bonheur, c'est toi ma plus grande force surtout lors de mes coups de blues dû à la rédaction.

Je te dédie cette thèse ma puce tu as été mon moteur et j'espère que tu seras fière de ta maman quand tu seras plus grande.

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des Figures	4
Liste des Tableaux	7
Introduction	8
I. Le Mésothéliome Pleural Malin (MPM).....	9
I.A. Le mésothélium pleural : description.....	9
I.A.1. La plèvre	9
I.A.2. Les cellules mésothéliales pleurales	10
I.B. Les pathologies de la plèvre.....	11
I.C. Etiologie et facteurs de risques du Mésothéliome pleural malin (MPM)	12
I.C.1. Fibres d’amiante et exposition.....	12
I.C.2. Autres facteurs de risques	13
I.D. Epidémiologie	16
I.D.1. Les chiffres dans le Monde.....	16
I.D.2. Incidence en France	17
I.D.3. Mortalité en France.....	18
I.E. Classification histopathologique du MPM.....	19
I.F. Caractéristiques moléculaires de la cancérogenèse pleurale.....	20
I.F.1. Dommages induits par les fibres d’amiante	20
I.F.2. Les altérations génétiques récurrentes du MPM.....	22
I.F.2.a. L’inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs.....	23
I.F.2.b. L’activation mutationnelle d'oncogènes dans les mésothéliomes n'a pas été décrite à ce jour:	29
I.F.2.c. Le CD44 et l’acide hyaluronique favorisent la signalisation oncogénique des mésothéliomes.....	31
I.G. Prise en charge diagnostique et thérapeutique du mésothéliome pleural malin ...	36

II. L'essai clinique de phase III Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS)	39
II.A. Le Protocole MAPS	39
II.A.1. Le Bevacizumab®, agent anti-angiogénique: nouveau traitement du MPM en association au doublet standard.....	40
II.A.2. L'ajout du Bevacizumab au doublet standard est associé à un meilleur pronostic	40
II.B. Le Protocole Bio-MAPS	41
III. La voie de signalisation Hippo.....	42
III.A. Description générale.....	42
III.B. Présentation détaillée des différents membres de la voie de signalisation Hippo.....	44
III.B.1. Les régulateurs :.....	44
III.B.1.a. RASSF1A, protéine clé de l'homéostasie cellulaire :.....	45
III.B.1.b. Autres régulateurs de la voie Hippo :.....	48
III.B.2. Le cœur de la voie Hippo : MST1/2 et LATS1/2 et leurs adaptateurs	51
III.B.2.a. Les kinases MST et leur protéine adaptatrice WW45.....	51
• Régulation de la mort cellulaire.....	53
○ MST1 et apoptose	53
○ MST1 et Autophagie	55
• Régulation de la prolifération cellulaire et de la migration	56
III.B.2.b. Les kinases NDR et leur protéine Adaptatrice.....	57
III.B.3. Les effecteurs terminaux : YAP et TAZ.....	60
III.B.3.a. Description générale.....	60
III.B.3.b. Les régulations de l'activité et la localisation subcellulaire de YAP/TAZ..	61
III.B.3.c. L'interactome de YAP/TAZ	66
III.B.3.d. Les gènes cibles de YAP et TAZ.....	66
III.C. Implication de l'altération de la voie Hippo dans l'histoire naturelle du MPM.	73

IV. Objectifs de la thèse :	74
Matériels et Méthodes.....	75
I. Etude Bio-MAPS: Analyse des statuts de méthylation des promoteurs des gènes RASSF/Hippo chez les patients atteints de MPM inclus dans la phase III de l'essai MAPS.....	76
I.A. Extraction des ADN <i>s</i> (<i>Kit QIAGEN FFPE®</i>)	76
I.B. Conversion au Bisulfite de sodium	76
I.B.1. Principe (Figure 51).....	76
I.B.2. Méthode (<i>Kit de Conversion de Bisulfite EPITECT, Qiagen®</i>).....	77
I.C. PCR spécifique de méthylation (MS-PCR)	77
II. Etude Bio-MAPS : Analyse des prélèvements tumoraux des patients inclus dans l'essai MAPS.....	79
III. Etudes <i>in cell</i> :	80
III.A. Lignées cellulaires.....	80
III.B. Culture cellulaire	80
III.C. Extraction des ARNs (Acides ribonucléiques) totaux.....	81
III.D. Transcription inverse et Réaction de polymérisation en Chaîne (RT-PCR)	81
III.D.1. Transcription inverse (RT)	81
III.D.2. Réaction de polymérisation en Chaîne (PCR) en temps réel.....	82
III.D.3. Réaction de polymérisation en Chaîne (PCR) semi-quantitative	82
III.E. Détection protéique... ..	83
III.E.1. ...par Immunofluorescence (IF)	83
III.E.2. ...Western Blot (WB).....	83
III.F. Test de Mort Cellulaire Programmée	84
III.F.1. Mesure de l'activité Caspase 3/7	84
III.F.2. Test de Fragmentation d'ADN (<i>kit Cell Death Detection ELISA Roche®</i>)... ..	85
III.G. Incorporation de BrdU (<i>Millipore®</i>).....	85
III.H. Invasion cellulaire en Matrigel®.....	86
III.I. Croissance cellulaire sans adhésion	86
III.I.1. Culture 3D Nunclon Sphera BD®	86

III.I.2. Croissance en agar (Millipore®)	86
III.J. Evaluation de l'activité des MMP2/9 par zymographie.....	87
IV. Statistiques	87
V. Ethique	88
Résultats.....	89
I. La voie RASSF/Hippo est fréquemment perturbée dans le mésothéliome pleural malin : l'inactivation de MST1 prédit un moins bon pronostic chez les patients atteints de MPM car elle favorise l'invasion, la croissance sans adhésion, la prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules mésothéliales tumorales.....	90
I.A. L'hyperméthylation du promoteur du gène <i>MST1</i> prédit une moins bonne survie des patients atteints de MPM et inclus dans l'essai MAPS.....	90
I.B. Identification et caractérisation de modèles cellulaires d'étude du MPM.....	92
I.B.1. Les cellules des lignées H2052, H28, H2452 et MSTO-221H présentent les altérations récurrentes du MPM	92
I.B.2. Fonctionnalité de la voie Hippo dans les cellules de lignées mésothéliales : YAP n'est pas inactivé par la confluence des cellules de la lignée H2052.....	95
I.B.3. Le niveau d'expression de YAP est associé à un phénotype invasif et à la capacité des cellules des lignées de MPM à croître sans adhésion	96
I.C. L'inactivation de MST1 favorise l'invasion, la croissance sans adhésion, la prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules mésothéliales tumorales	98
I.C.1. Mises au point des extinctions/réexpressions.....	98
I.C.2. L'inactivation de MST1 prédit un moins bon pronostic chez les patients atteints de MPM car entraine l'invasion, la croissance sans adhésion, la prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules mésothéliales tumorales	98
I.D. Résultats complémentaires.....	120
II. L'inactivation de RASSF1A contribue à « l'agressivité » des cellules de lignées mésothéliales tumorales car elle favorise la translocation nucléaire de YAP et l'expression d'amphiréguline	123
II.A.1. Mises au point des extinctions/réexpressions.....	123
II.A.2. La présence de RASSF1A diminue la capacité des cellules de lignées de MPM à envahir le Matrigel® et l'expression du CD44 standard.....	124

II.A.3. La perte d'expression de RASSF1A modifie l'activité des effecteurs terminaux YAP/TAZ des cellules de lignées MSTO-211H et H2452	125
II.A.4. La perte d'expression de RASSF1A favorise la dissémination des cellules de la lignée MSTO-211H en culture 3D ou en agar.....	127
III. Impact de l'expression du CD44 et l'amphiréguline chez les patients atteints de MPM et inclus dans l'essai MAPS.....	130
III.A. Le CD44 standard est un outil diagnostique du MPM	130
III.B. L'expression de l'Amphiréguline prédit une meilleure survie globale et survie sans progression des patients atteints de MPM.....	131
Discussion Générale.....	137
Conclusions et Perspectives	145
Bibliographie.....	151
Annexe : CPP – Essai de phase II/III MAPS	175

Liste des abréviations

A

AA: Acide Aminé
ADAM : alfa Disintegrin and Metalloproteinase
ADC: Adénocarcinome
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
AGC: Protein kinase A, protein kinase G and protein kinase C
AH: Acide Hyaluronique
AMOT: Angiomotine
AMPc: Adénosine monophosphate cyclique
ANKDRI: Ankyrin repeat domain-containing protein 1
ANOVA: Analyse of variance
APC: Anaphase Promoting Complex
aPKC: atypical protéine kinase C
AREG: Amphiréguline
ARN: acide ribonucléique
ATCC: American Type Culture Collection
Atg: Autophagie related genes
ATM: Ataxie Telangiectasie Mutant
ATP: Adénosine TriPhosphate

B

BAP-1: BRCA1 associated protein-1
Bax: Bcl-2 associated X
Bcl-2: B cell lymphoma gene 2
BRCA1: Breast Cancer 1
BrdU: Bromodeoxyuridine
BSA: Bovine Serum Albumin
BVZ: Bevacizumab

C

C: Cytosine
CAM: Cell Adhesion Molecule
Cdc: Cell division cycle protein
CDK: Cyclin Dependent Kinase
CDKI: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
CDKN2A: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CépiDc: Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès

CIRC: Centre International de Recherche sur le Cancer

CK1δ/ε: Casein kinase 1
CNK1: Connector enhancer of kinase suppressor of ras 1
Crab: Crumbs
CSC: cellules souches cancéreuses
CTGF: Connective Tissue Growth Factor
Cyr61: Cysteine-rich angiogenic inducer 61

D

DAG: Diacylglycérol
DAP4: Death Associated Protein-4
DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DFS: disease-free survival
DTT: DithioThréitol

E

EDTA: Ethylene Diamine Tetra acétique acide
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases
ERM: Ezrin/radixin/moesin
Ex: Expanded
EZH2: Enhancer of zeste homolog 2

F

FACS: Fluorescence-activated cell sorting
FAK: Focal Adhesion Kinase
FAS: Apoptosis stimulating fragment
FERM: 4.1-Ezrin-Radixin-Moesin
FRMD6: FERM domain-containing protein 6

G

GDP: Guanosine DiPhosphate
GEF: GDP/GTP exchange factor
GPCR: G protein-coupled receptors
GSK3: Glycogen synthase kinase 3
GTP: Guanosine TriPhosphate

H

H2B: Histon 2B
HBEC: Human Bronchial Epithelial Cells
HDM2: Human double minute 2 homolog
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HGFR: Hepatocyte Growth Factor Receptor
HSPG: Proteoglycanes à héparane sulfate

I

IAP: Inhibitor of apoptosis protein
IFCT: Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique
IGF: Insulin-like growth factor
IGF-1R: Insulin-like growth factor-1 receptor
IL6: Interleukine-6
IMIG: International Mesothelioma Interest Group
INCa: Institut national du cancer
INK4: Inhibitor of Cdk4
Inserm: Institut national de la Santé et de la Recherche médicale
InVS: Institut de veille sanitaire

J

JNK: Jun N-terminal Kinase

K

kDa: kilodalton
Kibra: Kidney and brain expressed protein
KRAS: Kirsten Rat sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog

L

LATS: Large Tumour Suppressor
LC3: Light Chain 3
LIMK: Lin11/Isl-1/Mec-3 kinase
LKB1: Liver kinase B1

M

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MAPS: Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study
MDM2: Mouse double minute 2 homolog

MEC: Matrice extracellulaire
MEK: Mitogen-Activated ERK Kinase
miARN: Micro ARN
M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus
MMP: Matrix Metalloproteinases
MOAP-1: Modulator of Apoptosis-1
MOB: Mps One Binder
MPM: Mésothéliome Pleural Malin
MS-PCR: PCR spécifique de méthylation
MST: Mammalian Sterile 20-like kinase
MT1-MMP: Membrane type 1 Metalloprotease
mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

N

NDR: Nuclear Dbf2 Related
NF2: NeuroFibromatosis type 2
NFκB: Nuclear Factor kappa B
NGS: Next Generation Sequencing
Nore1: Novel Ras Effector 1
NPHP4: Nephronophthisis 4
NRDc: *N*-arginine dibasic convertase
NTR: N-Terminal Regulatory domains

O

OMS: Organisation Mondiale de la Santé
OS: Overall survival

P

PAR: Protease-activated receptors
PBS: Phosphate Buffered Saline
PC: pro-protéine convertase
PCP: Polarité planaire cellulaire
PD-1: programmed cell death protein 1
PDGF: Platelet Derived Growth Factor Receptor
PD-L1: PD-Ligand 1
PDZ: PSD95/Dlg1/Zo-1
PFS: Progression Free Survival
PHLPP1/2: Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PKA: Protein Kinase A
PKC: Protein Kinase C

PNSM: Programme National de Surveillance des Mésothéliomes

PP1: Protéine phosphatase 1

PP2A: Protéine Phosphatase de type 2A

PPE: pleuro-pneumectomie élargie

PRC2: Polycomb Repressive Complex 2

PTPN14: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14

PUMA: P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis

R

RA: Ras association

Rac: Ras related c3 botulinium toxin substrate 1

Ras: Ras association domaine family

RASSF1A: Ras association domain family 1 isoform A

Rb: Rétinoblastome

Rho: Ras homolog gene

ROCK: Rho-associated protein kinase

ROS: Reactive Oxygen Species

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RTK: Récepteur tyrosine-kinase

RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction

S

SARAH: Salvador, RASSF, Hippo

SAV: Salvador

SCID: Severe Combined ImmunoDeficiency

Scrib: Scribble

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SEM: Standard Error of the Mean

Ser/Thr: Sérine/Thréonine

siRNA: small interfering ribonucleic acid

Sirt1: Sirtuin 1

SKF: Src family kinases

Smurf1: Smad ubiquitination regulatory factor 1

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

SV40: Virus simien 40

SVF: Sérum de veau foetal

T

T: Thymidine

TACE: Tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme

TAOK: thousand-and-one amino acids kinase

TAZ: Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif

TBS-T: Tris Buffered Saline-Tween 20

TCR: T- cell receptor

TEAD: Transcriptional enhancer factor TEF-1

TEM: Transition épithélio-mésenchymateuse

TEP: Tomographie par émission de positons

TGF: Transforming Growth Factor

TKI: tyrosine-kinase inhibitor

TNF α : Tumor Necrosis Factor alpha

TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor

TNM: Tumor Node Metastasis

TRAIL: Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand

TS: Thymidylate Synthase

TTF1: Thyroid transcription factor-1

U, V, W

U: Uracile

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

VGLL4: vestigial like 4

WIF1: Wnt Inhibitory Factor 1

Wnt: Wingless Integrase

W, X, Y

YAP: Yes-Associated Protein

ZO-1/2: Zonula occludens 1/2

Liste des Figures

Figure 1: La plèvre.....	9
Figure 2: Fibres d’amiante.....	12
Figure 3: Evolution du nombre de décès par mésothéliome au court du temps et pic de décès en 1997 après l’arrêt de l’utilisation en France des fibres d’amiante.....	13
Figure 4: Incidence du MPM en France chez les hommes et les femmes entre 1998 et 2006.....	17
Figure 5: Couverture géographique du PNSM (Programme national de surveillance des mésothéliomes) et organisation en France	17
Figure 6: Nombre de décès annuel par mésothéliome, observés et projetés, chez l’homme de 1955 jusqu’en 2050.....	18
Figure 7: Les types histologiques du mésothéliome pleural malin.....	19
Figure 8: L’amiante entraîne des dommages cellulaires conduisant à un mésothéliome.....	20
Figure 9: Activation de voies de signalisation intracellulaires par interactions directes de l’amiante au récepteur de l’EGF ou aux intégrines.....	21
Figure 10: Les longues fibres de nanotube de carbone entraînent un mésothéliome à l’instar des longues fibres d’amiante car altèrent l’expression du gène suppresseur de tumeur <i>CDKN2A (Ink4a/Arf)</i>	22
Figure 11: Cascade de signalisation NF2-Hippo.....	23
Figure 12: Mécanisme d’action des gènes suppresseurs de tumeur <i>p16</i> et <i>p14 (Arf)</i> sur le cycle cellulaire.....	24
Figure 13: Représentation schématique des 8 isoformes de <i>RASSF1</i>	27
Figure 14: Les différents domaines d’association protéine-protéine de <i>RASSF1A</i>	27
Figure 15: Les différents partenaires de <i>RASSF1A</i> dans le contrôle de l’homéostasie cellulaire.....	28
Figure 16: Structure génomique et protéique du CD44.....	31
Figure 17: Structure de la protéine CD44 et signalisation.....	32
Figure 18: Signalisation dépendante du CD44.....	33
Figure 19: Mécanismes d’action du CD44.....	34
Figure 20: Représentation schématique de l’essai randomisé IFCT-07101 MAPS.....	39
Figure 21: Les mécanismes d’inhibition de la signalisation VEGF dans le MPM.....	40
Figure 22: Survie globale et survie sans progression des patients atteints de mésothéliome pleural malin et inclus dans l’essai clinique MAPS.....	40
Figure 23: Centralisation et exploitation des prélèvements tumoraux de l’étude Bio-MAPS.....	41

Figure 24: Evolution des membres de la voie Hippo entre la drosophile, la souris et l'Homme.....	42
Figure 25: La voie de signalisation Hippo.....	43
Figure 26: Régulation de la voie de signalisation Hippo par les complexes jonctionnels (A) et l'environnement cellulaire (B)	43
Figure 27: RASSF1A et les filaments du cytosquelette.....	45
Figure 28: RASSF1A contrôle l'apoptose cellulaire.....	46
Figure 29: RASSF1A et cycle cellulaire.....	47
Figure 30: Les régulateurs de la voie de signalisation Hippo.....	48
Figure 31: Les kinases STE.....	51
Figure 32: Rôles des kinases MST dans l'homéostasie, la cicatrisation et la carcinogénèse.....	51
Figure 33: Structure des kinases MST.....	52
Figure 34: Structure du domaine SARAH de MST1 (résidus 432-480), interaction homotypique de MST1 et interaction hétérotypique de MST1 avec les protéines RASSF.....	53
Figure 35: Multiple voies de signalisation apoptotique médiées par les cibles des kinases MST.....	54
Figure 36: Les mécanismes moléculaires de l'autophagie.....	55
Figure 37: Signalisation MST1 dans les lymphocytes indépendante de la voie Hippo.....	56
Figure 38: Structure des kinases NDR.....	57
Figure 39: Domaines protéiques des effecteurs terminaux YAP et TAZ	60
Figure 40: Représentation schématique des variants (A) et isoformes (B) de YAP1-1 et YAP1-2.....	61
Figure 41: Régulation de la voie Hippo-YAP/TAZ par les GPCRs <i>via</i> la signalisation Rho GTPase et AMPc-PKA.....	62
Figure 42: Régulation directe ou indirecte de YAP/TAZ par les kinases du cœur de la voie Hippo.....	63
Figure 43: La localisation de YAP est régulée par l'environnement cellulaire.....	63
Figure 44: Interactome de YAP et TAZ.....	66
Figure 45: Interaction de YAP et TAZ avec leurs co-facteurs transcriptionnels et gènes cibles induits.....	66
Figure 46: Structure du gène et domaine protéique de l'AREG chez l'homme.....	67
Figure 47: Représentation schématique des différents modes de signalisation cellulaire de l'AREG..	68
Figure 48: La signalisation multicrine de l'AREG.....	69
Figure 49: L'amphiréguline améliore la fonction des cellules T régulatrices (Treg).....	70
Figure 50: Relation indirecte entre EGFR/KRAS et YAP.....	72

Figure 51: Représentation schématique du principe de la conversion au bisulfite de sodium par MS-PCR (PCR spécifique de méthylation).....	76
Figure 52: Exemple de visualisation des fragments d'ADNs amplifiés sous UV sur gel d'agarose 2,5% permettant de définir les statuts de méthylations des promoteurs des gènes RASSF.....	78
Figure 53: Séquençage Sanger des promoteurs de gène testés dans l'essai MAPS méthylés (M) ou non (U) alignés sur la séquence sauvage (WT).....	79
Figure 54: Les cellules des lignées H2052, H28, H2452, MSTO-211h et Met5A présentent certaines des altérations moléculaires fréquemment décrites dans les MPM	93
Figure 55: Taux d'expression protéique des marqueurs épithéliaux/mésenchymateux.....	94
Figure 56: YAP reste déphosphorylé à confluence dans les cellules de la lignée H2052.....	95
Figure 57: Capacité des cellules à envahir une matrice de Matrigel® ou de croître sans adhésion.....	96
Figure 58: Extinctions spécifique de l'expression du messenger et/ou de la protéine de MST1, YAP et TAZ dans les lignées mésothéliales humaines.....	98
Figure 59: L'expression élevée de YAP prédit une meilleure survie globale (OS: Overall survival) et survie sans progression (PFS: Progression Free Survival) des patients atteints de MPM et enrôlés dans l'essai MAPS.....	121
Figure 60: Cinétique d'expression/extinction de RASSF1A par plasmide/siARN dans les lignées H2052 et MSTO-211H.....	123
Figure 61: La capacité des cellules de lignées mésothéliales humaines à envahir une matrice est liée au taux d'expression du CD44 standard.....	124
Figure 62: Le gain d'invasion induit par la perte d'expression de RASSF1A dans les cellules de la lignée MSTO-211H s'accompagne d'une translocation nucléaire de YAP actif.....	125
Figure 63: Le gain d'invasion induit par la perte d'expression de RASSF1A dans les cellules de la lignée H2452 s'accompagne d'une translocation nucléaire de TAZ actif.....	126
Figure 64: Impact de la modification transitoire de RASSF1A sur la capacité des cellules de lignées mésothéliales à croître en culture 3D.....	127
Figure 65: Impact de la modification transitoire de RASSF1A sur la capacité des cellules de lignées mésothéliales à croître en agar	128
Figure 66: Médiane de survie global (OS) et sans progression (PFS) des patients avec un marquage AREG négatif <i>versus</i> AREG positif ou selon la localisation du marquage de l'AREG cytosolique (C) <i>versus</i> autres localisations (other).....	131
Figure 67: Extinction de l'AREG par transfection par siARN dans les lignées MSTO-211-H, H2452, H28 et H2052.....	132
Figure 68: Capacité des lignées de MPM à envahir une membrane de Matrigel (Invasion), croître en agar et en suspension.....	133
Figure 69: Capacité des lignées de MPM à proliférer et à induire l'apoptose.....	134

Liste des Tableaux

Tableau 1: Pays consommateurs d'amiante dans le monde.....	16
Tableau 2: Nombre de décès par mésothéliome en France de 2000 à 2009.....	18
Tableau 3: Marqueurs immunohistochimiques (IHC) capitaux pour le diagnostic du MPM.....	19
Tableau 4: Bilan des études des 20 dernières années s'intéressant au diagnostic du CD44 dans le MPM.....	35
Tableau 5: La 8 ^{ème} classification TNM des tumeurs pleurales définie par l'International Mesothélioma Interest Groupe (IMIG) en janvier 2017.....	36
Tableau 6: Séquences des couples d'amorces utilisées pour la détermination du statut de méthylation des promoteurs de gènes	77
Tableau 7: Présentation des principales caractéristiques connues des cinq lignées cellulaires de MPM au début de ce travail	80
Tableau 8: Séquences des différents couples d'amorces employées pour les amplifications par PCR.....	82
Tableau 9: Anticorps primaires utilisés pour l'immunodétection du Western Blot (WB) et/ou de l'immunofluorescence (IF).....	83
Tableau 10: Caractérisation des cinq lignées cellulaires de MPM (H2452, H2052, H28, MSTO-211H, Met-5A).....	92
Tableau 11: Conditions expérimentales des outils moléculaires utilisés pour l'analyse immunohistochimique de YAP et TAZ des patients inclus dans l'essai clinique MAPS.....	120
Tableau 12: Liste des siARN et plasmides utilisés pour la modification transitoire de RASSF1A et RASSF1C.....	123
Tableau 13: Protocole des IHC pour l'analyse du marquage du CD44 et de l'AREG des patients inclus dans l'essai clinique MAPS.....	130

Introduction

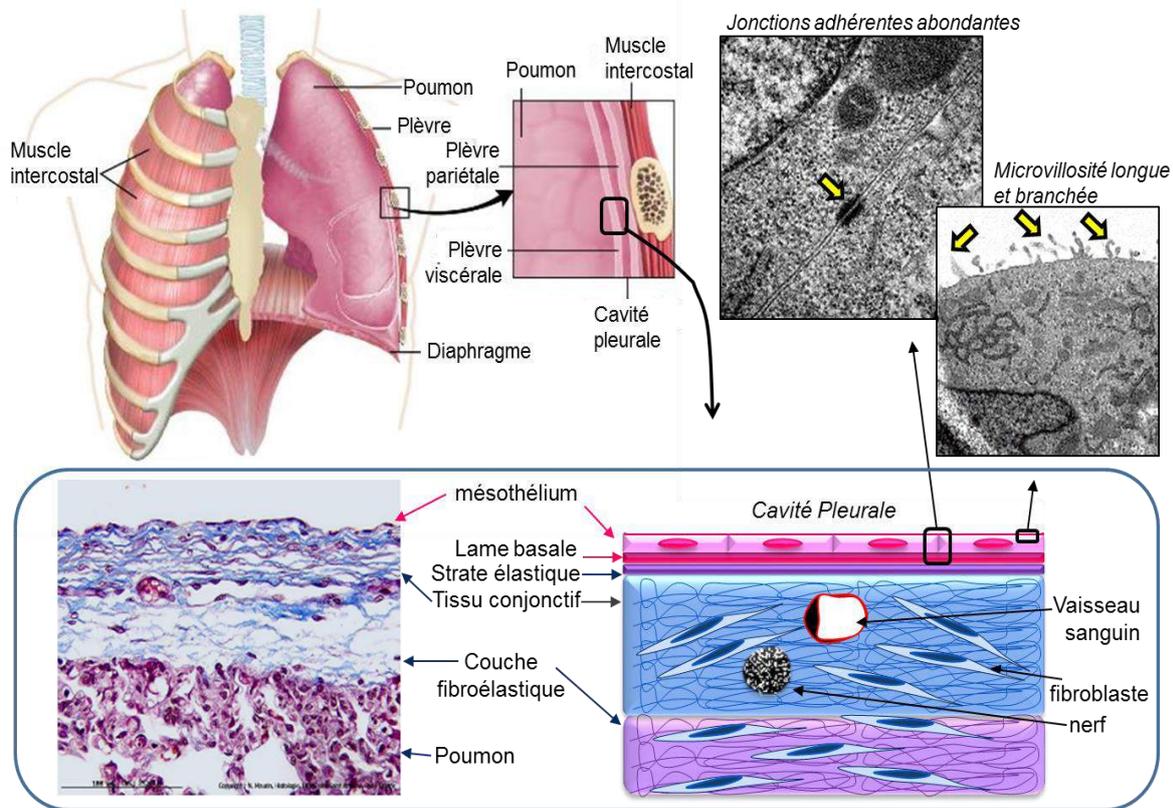


Figure 1 : La plèvre.

La plèvre, tunique séreuse enveloppant les poumons, est constituée d'un feuillet viscéral tapissant la surface du poumon et d'un feuillet pariétal tapissant la face interne de la cage thoracique. Ces deux feuillets délimitent une cavité virtuelle : la cavité pleurale.

Une préparation histologique de plèvre viscérale humaine colorée par un trichrome de Masson modifié Goldner (x250) révèle que la plèvre est délimitée par un épithélium unistratifié nommé mésothélium. En microscopie électronique, les cellules mésothéliales apparaissent fortement associées les unes aux autres par des jonctions adhérentes (x12000) et présentent de longues microvillosités branchées (x9000). Leur cytoplasme contient de nombreuses vésicules de pinocytose. Le mésothélium repose sur une lame basale dédoublée d'une strate élastique qui le sépare d'un tissu conjonctif.

I. Le Mésothéliome Pleural Malin (MPM)

I.A. Le mésothélium pleural : description

I.A.1. La plèvre

La plèvre, située entre les poumons et la cage thoracique, joue un rôle essentiel dans la mécanique ventilatoire car elle assure la cohésion du système pulmonaire et diminue les frottements occasionnés par les mouvements respiratoires. En plus d'être l'enveloppe mécanique du poumon, la plèvre participe également aux réactions immunitaires et inflammatoires en réponse aux agressions exogènes et endogènes.

La plèvre, une séreuse dérivée du coelome intra-embryonnaire, se constitue de deux feuillets :

- Un **feuillet viscéral** qui recouvre la surface du poumon y compris les faces médiastinales, diaphragmatiques et scissurales jusqu'à leur insertion hilare.
- Un **feuillet pariétal** tapissant la face interne de la cage thoracique.

Ces deux feuillets délimitent une cavité virtuelle appelée « cavité pleurale ». Cette cavité étanche, à une pression inférieure de 4 mm de mercure à la pression atmosphérique, contient 10 à 20 ml de liquide pleural, qui permet le glissement de ces feuillets l'un sur l'autre lors des mouvements respiratoires et peut héberger des cellules du système immunitaire inné dont des macrophages (Figure 1).

La plèvre est revêtue d'un épithélium unistratifié, dérivé du mésoderme, appelé mésothélium, constitué de cellules mésothéliales juxtaposées et jointives reposant sur une membrane basale qui le sépare d'un tissu conjonctif sous-mésothélial. L'épaisseur de chaque feuillet pleural se compose ainsi de cinq couches successives, qui sont depuis la cavité pleurale (Peng et Wang, 2003) (Figure 1) :

- Les cellules mésothéliales
- La membrane ou lame basale
- Une couche élastique superficielle
- Une couche de tissu conjonctif lâche contenant les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques, et les nerfs. Cette couche contient également une sous-couche d'adipocytes dans le feuillet pariétal.
- Une couche fibro-élastique profonde.

I.A.2. Les cellules mésothéliales pleurales

Les cellules mésothéliales, comme toutes cellules épithéliales, présentent des caractéristiques propres à leur état hautement différencié :

1) **leur morphologie** : ce sont des cellules pavimenteuses, comportant un noyau rond en position central ou légèrement ovalaire à petit nucléole.

2) **leur cohésion**, permise par les nombreuses interactions cellule-cellule qu'elles forment. Ces liaisons impliquent des molécules d'adhésion dépendantes (cadhérine, sélectine, intégrine) ou non du calcium (Cell Adherence Molecule ou CAM) ainsi que des jonctions intercellulaires de type adhérentes (desmosomes).

3) **leur polarité cellulaire** très marquée ; le domaine apical (en regard de la cavité pleurale) est le domaine le plus spécialisé, il porte de longues microvillosités flexueuses et branchées (Figure 1) et la plupart des récepteurs aux facteurs de croissance (EGF (Epidermal Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor)...). Le domaine basal, lui, établit des jonctions de type cellule-matrice (hémidesmosome) ainsi que des adhésions focales grâce aux molécules d'adhésion qu'il exprime (protéoglycanes à héparane sulfate (syndécane 1, syndécane 4), récepteur à l'acide hyaluronique (CD44)), intégrines, molécules qui interagissent avec les composants de la lame basale (collagène de type I et IV, réticuline, fibronectine, laminine).

4) **leur cytosquelette** : les filaments intermédiaires de ces cellules sont constitués de cytokératines ; ces filaments de kératine s'enroulent autour du noyau de la cellule, et se projettent et s'attachent aux desmosomes et hémidesmosomes, contribuant ainsi à la rigidité de l'épithélium et au maintien de la cohésion entre cellules adjacentes. Ces cellules contiennent également des filaments intermédiaires composés de vimentine.

5) **l'absence de prolifération cellulaire** : les cellules mésothéliales, bloquées en G0/G1, sont renouvelées par la prolifération et la différenciation de cellules basales progénitrices. Les cellules mésothéliales se renouvellent lentement (<1% de cellules sont en mitoses dans un mésothélium).

De par leur origine mésodermique, contrairement aux autres cellules épithéliales, la cellule mésothéliale possède quelques propriétés mésenchymateuses, elle exprime notamment des molécules telles que la N-cadhérine (protéine des complexes jonctionnels) ou encore, comme

évoqué plus haut, de la vimentine (constituant des filaments intermédiaires). Ces propriétés mésenchymateuses leur confèrent une certaine plasticité.

Le mésothélium pleural assure plusieurs fonctions :

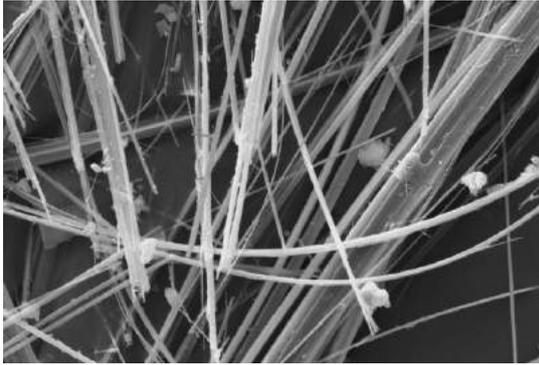
- Il constitue une barrière de protection contre les agressions physiques et les micro-organismes du fait que les cellules mésothéliales partagent entre elles des jonctions serrées.
- Il constitue une barrière de surface non adhésive facilitant les mouvements respiratoires.
- Il assure une fonction de présentation antigénique, le contrôle du transport des fluides et des cellules, depuis le secteur vasculaire et lymphatique vers l'interstitium et le poumon sous-jacent. Les cellules mésothéliales sécrètent aussi des cytokines, impliquées dans la réaction inflammatoire et immunitaire, en stimulant la prolifération des lymphocytes T CD4+.
- Enfin les cellules mésothéliales contrôlent la composition du liquide pleural (naturellement pauvre en protéides et en cellules), les éléments de ce liquide transitent *via* des vésicules de pinocytose à travers le cytoplasme de ces cellules.

I.B. Les pathologies de la plèvre

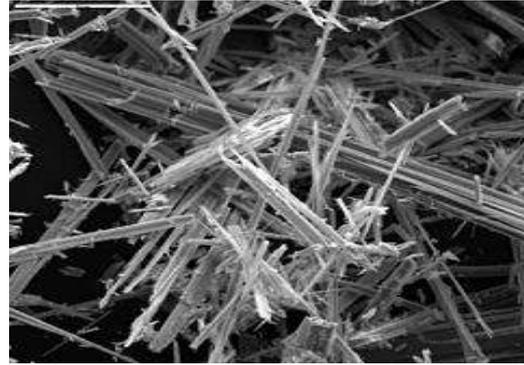
La plèvre est le siège de pathologies bénignes (épanchements exsudatifs de nature infectieuse ou inflammatoire, fibrose allant jusqu'à la constitution de véritables "plaques" pleurales) ainsi que de tumeurs bénignes mésenchymateuses (tumeur pleurale fibreuse solitaire, tumeur adénomatoïde, lipome), ou maligne primitive (mésothéliome). La plèvre peut également devenir le site secondaire de développement de tumeurs cancéreuses d'origine pulmonaire (cas fréquent du fait de la contiguïté entre le poumon et la plèvre) ou extra-pulmonaire, métastatique (notamment mammaire) (Cagle et Allen, 2011).

Le mésothéliome pleural malin (MPM) qui fait l'objet de ce travail de thèse, est ainsi une tumeur primitive rare (autour de 1000 cas annuel en France) mais extrêmement agressive, se développant à partir des cellules mésothéliales.

A Fibre Serpentine: Chrysotile



Fibre Amphibole: Anthophyllite



B Amosite



Crocidolite



Trémolite



Chrysotile



C

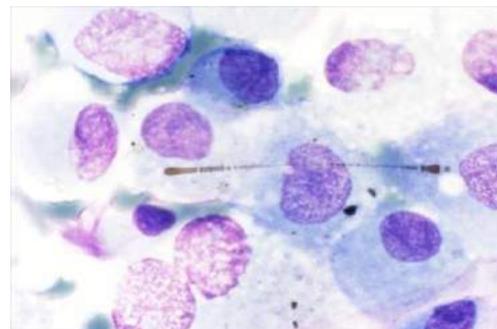
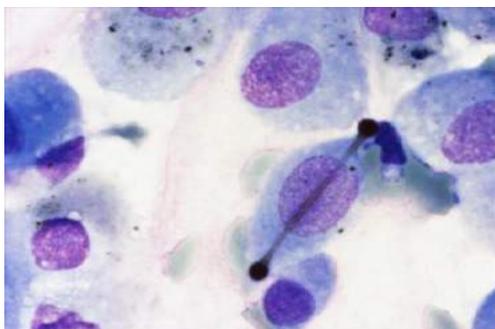


Figure 2: Fibres d'amiante.

A: Fibre serpentine (souple, pliable et courte) et fibre amphibole (plus rigide, longue et fine), en microscopie électronique à balayage. **B:** Comparaison structurale des différents types de fibres (microscopie électronique). **C:** Cellules au contact de corps abestotiques en microscopie photonique.

I.C. Etiologie et facteurs de risques du Mésothéliome pleural malin (MPM)

Le MPM survient le plus souvent suite à une exposition professionnelle à l'amiante (83% des cas), toutefois d'autres facteurs étiologiques sont aujourd'hui connus.

I.C.1. Fibres d'amiante et exposition.

L'amiante est une fibre minérale naturelle (silicate fibreux), classée cancérigène de catégorie 1 par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), dont il existe deux sous-groupes (Ruffié et Margery, 2007) (Figure 2) :

- Les fibres **serpentine**s ou chrysotiles : fibres courtes, pliables et souples.
- Les fibres **amphiboles** (crocidolite, amosite, trémolite, anthophyllite et actinolite) : fibres longues et fines, comparables à des aiguilles.

Ces fibres ont été massivement utilisées dans l'industrie après la première Guerre Mondiale, pour la multiplicité de leurs usages liée à leurs caractéristiques physicochimiques (résistance à de hautes températures, inertie chimique, imputrescibilité, résistance mécanique), leur élasticité et leur faible coût. Trois principaux types d'exposition à l'amiante sont répertoriés (Institut de veille sanitaire (InVS)) :

- **les expositions professionnelles** : Cette exposition directe autrefois liée à l'extraction et à la transformation mais maintenant due au désamiantage.
- **les expositions extraprofessionnelles** ; expositions para-professionnelles (nettoyage des vêtements souillés par les poussières d'amiante), domestiques (objets ménagers contenant de l'amiante) et les bricoleurs occasionnels (Andujar *et al.*, 2016).
- **les expositions environnementales** ; expositions liées aux gisements naturels d'amiante (site géologique), aux installations libérant des fibres dans l'atmosphère (industrielle: mine à ciel ouvert, ou usine de transformation de l'amiante; dégradation, rénovation ou déconstruction de bâtiments amiantés) ou à la pollution urbaine (Ruffié et Margery, 2007). Ces expositions environnementales représentaient 6.3% des dossiers « amiante » enregistrés par le Fonds d'indemnisation des victimes de l'amiante en 2007.

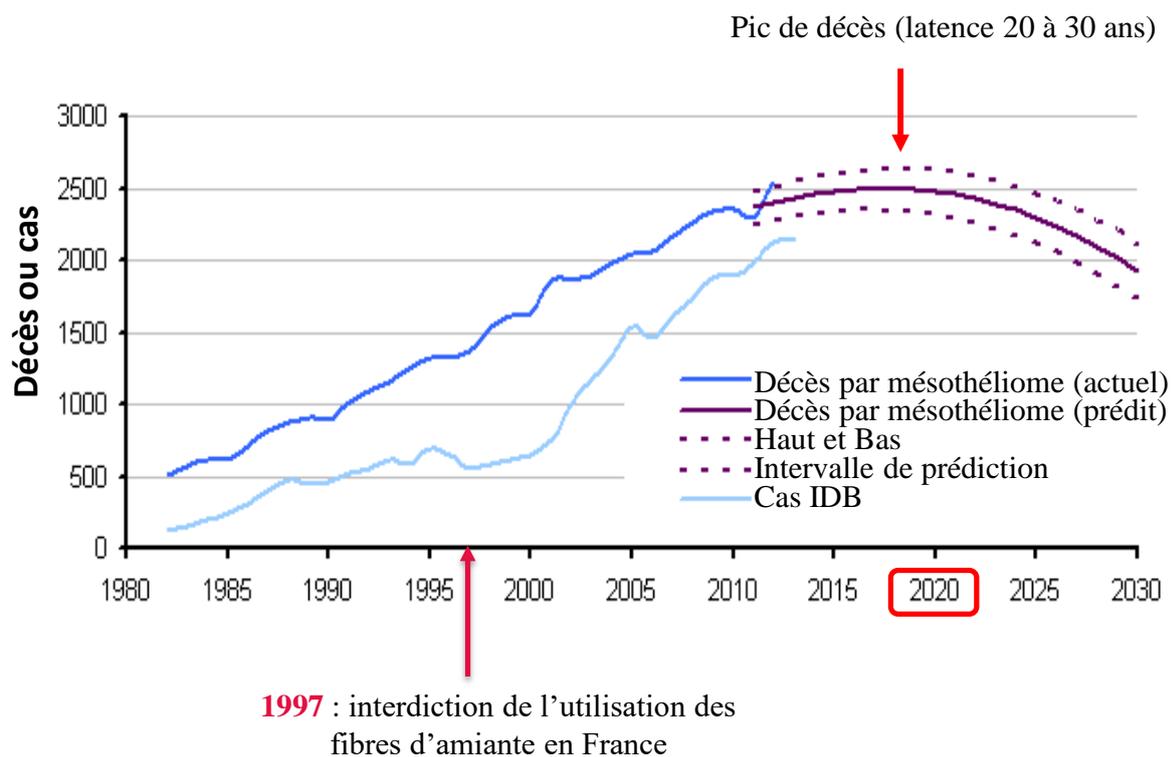


Figure 3 : Evolution du nombre de décès par mésothéliome au court du temps et pic de décès après l'arrêt en 1997 de l'utilisation en France des fibres d'amiante.
(<https://www.asbestosis-compensation.co.uk/news/asbestos-disease-statistics.html>)

Le risque de développer un mésothéliome suite à une exposition aux fibres d'amiante dépend de plusieurs facteurs :

- Le temps écoulé depuis le début de l'exposition, la dose cumulée d'amiante (fibres/ml d'air x nombres d'années), les pics d'exposition et le type de fibre inhalée. Une relation dose-effet a en effet été démontrée, et il n'existe aucun seuil en dessous duquel il n'y a pas d'excès de risque de MPM (Scherpereel, 2006).
- Les propriétés physicochimiques ainsi que la taille et la géométrie des fibres d'amiante (déterminant leur pénétration dans les voies respiratoires) et leur bio-persistance en milieu pulmonaire influencent leurs propriétés cancérogènes. Il est reporté que les amphiboles, plus utilisées dans les pays anglo-saxons, ont un pouvoir carcinogène plus important que les chrysotiles, les fibres supérieures à 5µm de longueur et inférieures à 0,25µm de diamètre étant plus nocives (Gilham *et al.*, 2016).

Le mésothéliome se développe très lentement et débute généralement plusieurs dizaines d'années avant le diagnostic radio-clinique. En effet, il existe une période de latence assez longue de 20 à 40 ans entre l'exposition à l'amiante et l'apparition de la maladie, nécessaire au développement multi-étapes de ce cancer et pouvant varier selon les individus (Hodgson *et al.*, 2005; Marinaccio *et al.*, 2007) (Figure 3).

I.C.2. Autres facteurs de risques

Bien que l'amiante soit le principal agent étiologique du MPM, dans près de 20% des cas, d'autres facteurs de risques sont incriminés (Andujar *et al.*, 2016):

- **Les autres fibres minérales ou artificielles :**

L'ériionite, classée cancérogène par le CIRC, est une fibre minérale naturelle de la famille des zéolites (Metintas *et al.*, 2002) possédant des propriétés physiques similaires à l'amiante et présentant des caractéristiques et des dimensions très comparables aux crocidolites (Carbone *et al.*, 2007). Cette fibre est clairement associée au risque de survenue du MPM : l'exposition à l'ériionite, retrouvée dans la roche des habitations de certains villages de la Cappadoce en Turquie, a induit un mésothéliome chez la moitié de la population (Baris et Grandjean, 2006; Baris *et al.*, 1987); et causée 50% des décès chez ces habitants (Carbone *et al.*, 2007). Cette fibre a été plus récemment détectée aux États-Unis dans le Dakota et le Montana (Carbone *et al.*, 2011), contaminant le talc médicinal de la marque Colgate, et dans le centre du Mexique,

et est associée dans ces régions à un risque accru de MPM et de cancer du poumon (Ortega-Guerrero *et al.*, 2015).

L'exposition à d'autres fibres minérales naturelles (fluoro-édénite de la famille des amphiboles), ou artificielles (les nanotubes de carbone) (Miozzi *et al.*, 2015) est également susceptible d'être associée à un excès de cas de mésothéliome dans la population. Les fibres céramiques réfractaires, dont le potentiel cancérigène est prouvé expérimentalement chez l'animal (Bunn *et al.*, 1993) et par des données humaines (Greim *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2012), sont classées cancérigènes catégorie 2B.

Les nanotubes de carbone peuvent présenter un risque d'inhalation semblable à celui de l'amiante, en raison de leur ressemblance élevée et de leurs propriétés biopersistantes. Récemment Chernova et collaborateur, ont montré que les nanotubes de carbone à longues fibres induisent un mésothéliome malin avec perte d'expression *CDKN2A* de la même façon que l'amiante (Chernova *et al.*, 2017).

- **Les radiations ionisantes**, le plus souvent après une radiothérapie thoracique en mantelet pour un lymphome, ou encore chez des travailleurs d'énergie atomique exposés à de faible niveau de radiation (Metz-Flamant *et al.*, 2011). Si plusieurs articles de la littérature font référence à l'irradiation comme inductrice de mésothéliome (Chirieac *et al.*, 2013; Farioli *et al.*, 2013; Hodgson *et al.*, 2007), peu de travaux établissent un lien statistiquement significatif entre un mésothéliome et l'exposition aux radiations ionisantes non médicales (Goodman *et al.*, 2009).

- **Le virus simien 40 (SV40)**, est un virus à ADN identifié pour la première fois chez le singe puis inoculé chez l'homme par des vaccins contre la poliomyélite contaminés (Cutrone *et al.*, 2005). Son rôle dans l'étiologie du MPM a été très discuté malgré de nombreuses publications sur ce sujet (López-Ríos *et al.*, 2004; Pass *et al.*, 2004; Thanh *et al.*, 2016). Il a été établi que des séquences ADN du SV40 ont contaminé accidentellement de nombreux laboratoires à l'origine de ces articles, basés sur des réactions de PCR positives du fait de ces contaminations dans des échantillons de mésothéliomes, lymphomes non Hodgkiniens, d'épendymomes, ou tumeurs des plexus choroïde. Le SV40 est un virus oncogène du singe (pas l'homme) par deux protéines, l'Ag T et l'Ag t qui se fixent aux gènes suppresseurs p53 (TP53) et Rb pour les inactiver et permettre ainsi la réplication virale. Les séquences codantes de ces deux gènes viraux ont servi à construire les plasmides bactériens à l'origine de l'essor de la biologie moléculaire et il était donc logique d'amplifier de telles séquences par PCR dans des laboratoires de biologie moléculaire utilisant largement de tels plasmides.

Cependant, le SV40 peut être oncogène à lui seul, causant une transformation maligne de cellules murines, simiesques, voire mésothéliales humaines, et son association avec une exposition des cellules à l'amiante induisait une résistance à l'apoptose induite par la chimiothérapie (Cleaver *et al.*, 2014). Ce virus avait contaminé les lots de vaccin contre la poliomyélite de 1956 à 1961 et aurait pu contaminer ainsi des millions d'enfants, explication avancée pour rendre compte de la détection de séquences virales dans des tumeurs humaines. Cependant, après cette contamination accidentelle, aucune étude épidémiologique de population n'a pu démontrer une augmentation d'incidence de mésothéliomes ou de lymphomes. La dernière étude négative remonte à 2003, sur le registre de l'ensemble de la population Danoise où 19,5 millions de personnes/années ont été observées (Engels *et al.*, 2003).

- **Les facteurs génétiques constitutionnels.** Le seul gène de prédisposition au mésothéliome clairement identifié est *BAP-1* (BRCA1 associated protein-1) dont la perte d'expression a été reliée à la survenue de mésothéliome (Carbone et Yang, 2017; Testa *et al.*, 2011). En effet, dans la littérature, la présence d'un faible nombre de mésothéliome chez l'enfant ainsi que l'agrégation de cas familiaux suggérait déjà une possible cause génétique (Ascoli *et al.*, 2007; de Klerk *et al.*, 2013). L'étude de familles de Cappadoce (Turquie) exposées à une contamination aérienne par des mines d'amiante à ciel ouvert, a permis l'identification de ce gène (Carbone *et al.*, 2007). En effet dans des maisons pourtant mitoyennes, aucun membre d'une première famille n'avait jamais présenté de mésothéliome, sur trois générations, alors que plusieurs membres de la famille voisine, présentaient un MPM à chaque génération. Ces données ont permis, après prélèvement sanguin (extraction de l'ADN leucocytaire de tous les membres de cette famille) de découvrir l'implication du gène *BAP-1* (3p21.1) dans le développement du MPM. Les sujets atteints de mésothéliomes avaient une mutation stop de *BAP-1* sur un allèle et une perte de l'autre allèle, aboutissant à une perte d'expression protéique, désignant *BAP-1* comme un gène suppresseur de tumeur. Rapidement, comme tous les autres gènes suppresseurs, un véritable syndrome familial de susceptibilité aux cancers a été identifié, par mutation germinale de *BAP-1*, avec la survenue dans ces familles, à une fréquence anormalement élevée de tumeurs rares telles que le mélanome uvéal, le cancer du rein à cellules claires, ou encore le mésothéliome en cas d'exposition à l'amiante (Matullo *et al.*, 2013; You *et al.*, 2007). *BAP-1* est une protéine capable d'interagir avec BRCA1 (Breast Cancer 1) dont la fonction reste encore discutée. Son activité d'histone déubiquitase au sein du complexe Polycomb la relie au contrôle épigénétique de l'expression

Tableau 1: Pays consommateurs d'amiante dans le monde.

Pays consommateur	Consommation d'amiante en tonnes (en 2014)
Russie	607 827
Chine	507 016
Inde	379 011
Brésil	154 233
Kazakhstan	67 508
Indonésie	53 901
Sri Lanka	52 214
Thaïlande	42 618

La consommation d'amiante mondiale est toujours soutenue. En Europe, le marché est pratiquement inexistant à l'exception de la Russie qui fait partie des principaux consommateurs avec la Chine, l'Inde et le Brésil qui consomment à eux 4 plus de 84 % de l'amiante mondiale (d'après l'Aléa). C'est en Chine, en Thaïlande et dans le sous-continent indien que la consommation d'amiante augmente le plus fortement.

des gènes, cependant son association à BRCA1 l'impliquerait dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Des mutations somatiques de *BAP-1* sont retrouvées dans 20 à 25% des mésothéliomes sporadiques en dehors de tout contexte familial avec une prédominance dans les formes épithéliales, et associées à un meilleur pronostic. Les formes familiales de mésothéliomes avec mutation de *BAP1* représenteraient 6% des MPM (Ohar *et al.*, 2016), cependant, les mutations germinales sont rares parmi les MPM sporadiques (Sneddon *et al.*, 2015).

- **Des facteurs hormonaux** au vu du nombre croissant de cas de MPM recensé chez les femmes sans lien avec une exposition évidente à l'amiante (Le Stang *et al.*, 2010), mais qui pourrait aussi suggérer des expositions industrielles, environnementales ou para-professionnelles non identifiées chez ces femmes.

- **Des agents chimiques** tels que bromates, nitroso-urées ou nitrosamines.

- **Par contre, le tabac**, contrairement au cancer bronchique n'est pas un facteur de risque du mésothéliome (Erren *et al.*, 1999).

I.D. Epidémiologie

I.D.1. Les chiffres dans le Monde

Le MPM longtemps négligé dû à sa rareté est aujourd'hui considéré comme un véritable problème sanitaire autant que socio-politique. Ce revirement de situation témoigne de l'impact des projections épidémiologiques alarmistes avec une augmentation de l'incidence du MPM en Europe de l'Ouest attendue jusqu'en 2020, avec au total 250.000 décès dans le monde dans les 30 prochaines années (Peto *et al.*, 1999), principalement chez d'anciens travailleurs exposés à leur insu à l'inhalation d'amiante, sans que les autorités gouvernementales n'aient pris conscience des risques de ces fibres.

Au cours de la seconde moitié du 20^{ème} siècle et encore aujourd'hui, malgré l'interdiction de l'amiante, l'incidence du MPM ne cesse d'augmenter à l'échelle mondiale avec une très forte létalité (10 000 à 15 000 décès chaque année dans le monde) à cause de son délai de latence important entre l'exposition à l'amiante et l'apparition du cancer. L'incidence atteint environ 8 à 30 cas/million/an dans les nations occidentales industrialisées, en fonction de l'exposition des populations à l'amiante durant les décennies passées (Robinson, 2012). Malgré l'interdiction de l'amiante dans de nombreux pays, le MPM reste un problème de santé publique majeur. En effet, l'épidémie gagne les pays émergents ou en voie de développement, qui utilisent l'amiante en abondance de façon peu voire non réglementée (Tableau 1).

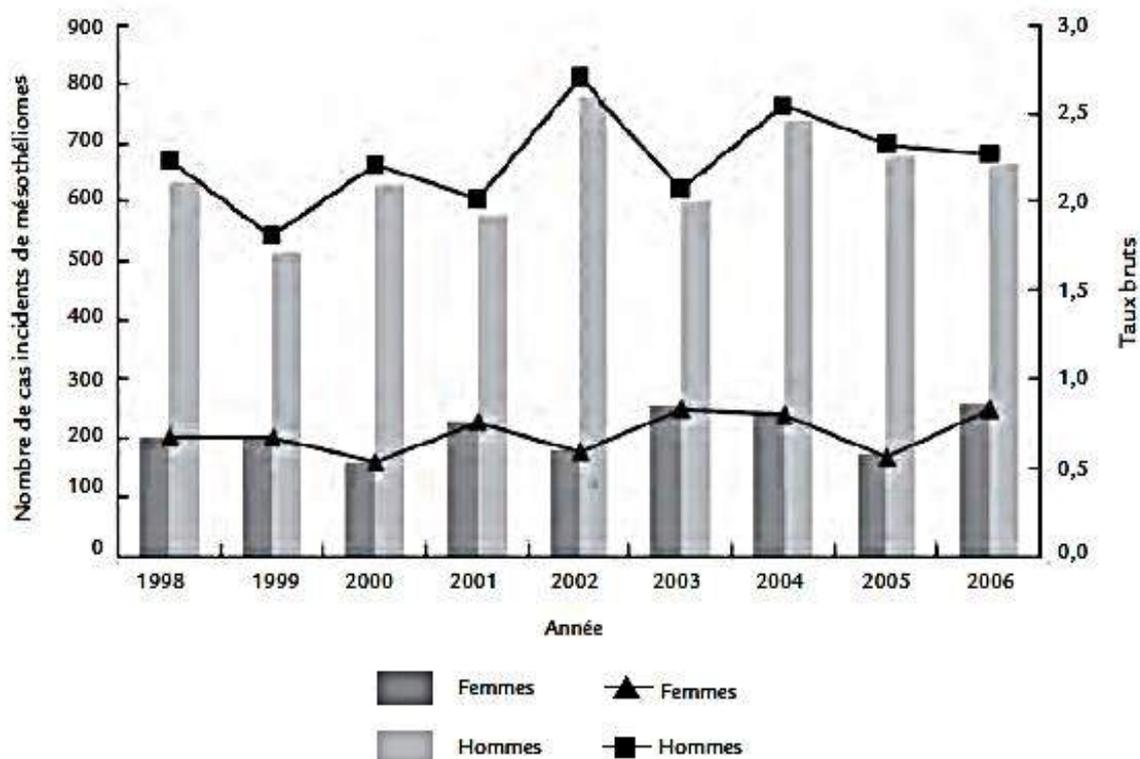


Figure 4 : Incidence du MPM en France chez les hommes et les femmes entre 1998 et 2006 (D'après l'InVS-PNSM).

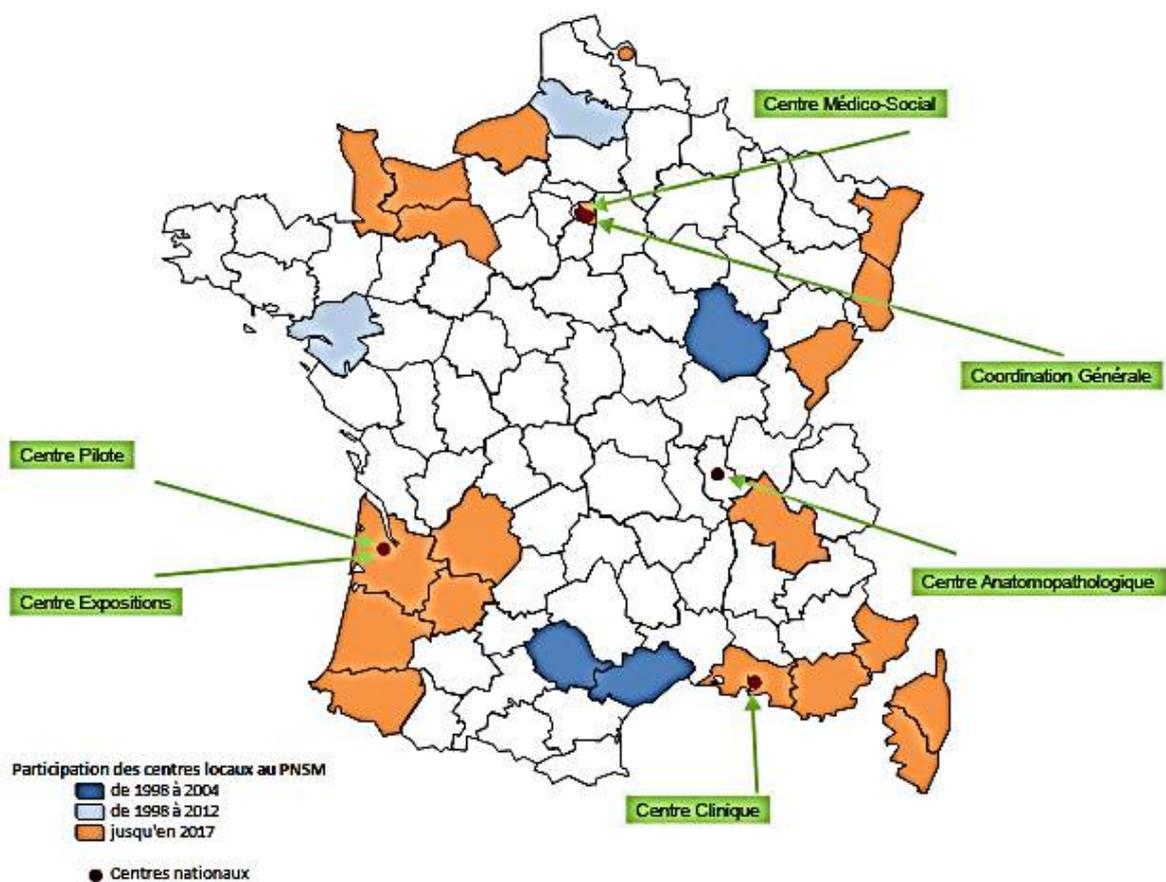


Figure 5 : Couverture géographique du PNSM (Programme national de surveillance des mésothéliomes) et organisation en France (D'après Ilg *et al*, 2017).

I.D.2. Incidence en France

Le mésothéliome représente moins de 1 cas/million/ans en France dans la population générale, mais 50 à 100 cas/million/ans dans la population exposée à l'amiante. L'incidence actuelle du MPM est d'environ 1000 cas/an en France, soit une incidence d'environ 16 cas/million/an, plus importante chez l'homme que chez la femme due principalement à l'exposition professionnelle à l'amiante. Le pic de l'incidence se situe aux alentours de 65 ans, en raison du long délai de latence de l'ordre de 20 à 40 ans entre le début de l'exposition et le développement du cancer.

La Normandie compte parmi les régions les plus touchées avec une incidence plus élevée (20 nouveaux cas ou plus par an), à cause de la concentration d'anciennes usines de transformation de l'amiante dans la vallée de la Vère autour de Condé-sur-Noireau, ou de chantiers navals à Port-en Bessin, Cherbourg ou au Havre.

Au vu de l'augmentation de l'incidence française du MPM depuis les années 1960 (Figure 4), un Programme national de surveillance des mésothéliomes (PNSM), couvrant aujourd'hui 21 départements, a été mis en place en 1998 par l'InVS (Figure 5). Le PNSM constitue un système de surveillance épidémiologique des effets de l'amiante sur la santé de la population française à travers le suivi permanent du MPM. Ces principaux objectifs sont :

- d'estimer l'incidence nationale du mésothéliome en France, son évolution et de la fraction attribuable aux expositions professionnelles à l'amiante;
- de contribuer à la recherche d'autres facteurs étiologiques éventuels ;
- de contribuer à la recherche et à l'amélioration des techniques diagnostiques du mésothéliome dont le diagnostic anatomopathologique;
- d'évaluer sa prise en charge médico-administrative (reconnaissance du MPM comme maladie professionnelle).

D'après l'InVS 2015, le pic d'incidence sera atteint en France en 2020 avec 1200 cas/an à cause du pic d'utilisation dans les années 1970. D'après le registre national des mésothéliomes, le plateau d'incidence aurait été atteint chez l'homme mais continuerait d'augmenter chez la femme, particulièrement chez des femmes sans exposition connue à l'amiante (Le Stang *et al.*, 2010). Afin d'affiner les estimations épidémiologiques en complétant les données du PNSM, la déclaration obligatoire du mésothéliome a été créée en janvier 2012, faisant de ce cancer la 31^{ème} maladie à déclaration obligatoire.

Tableau 2: Nombre de décès par mésothéliome en France de 2000 à 2009 (Source: Inserm-CépiDC).

Année	Hommes	Femmes	Total
2000	765	265	1 030
2001	701	270	971
2002	815	260	1 075
2003	754	275	1 029
2004	775	273	1 048
2005	774	298	1 072
2006	825	279	1 104
2007	773	269	1 042
2008	803	302	1 105
2009	826	289	1 115

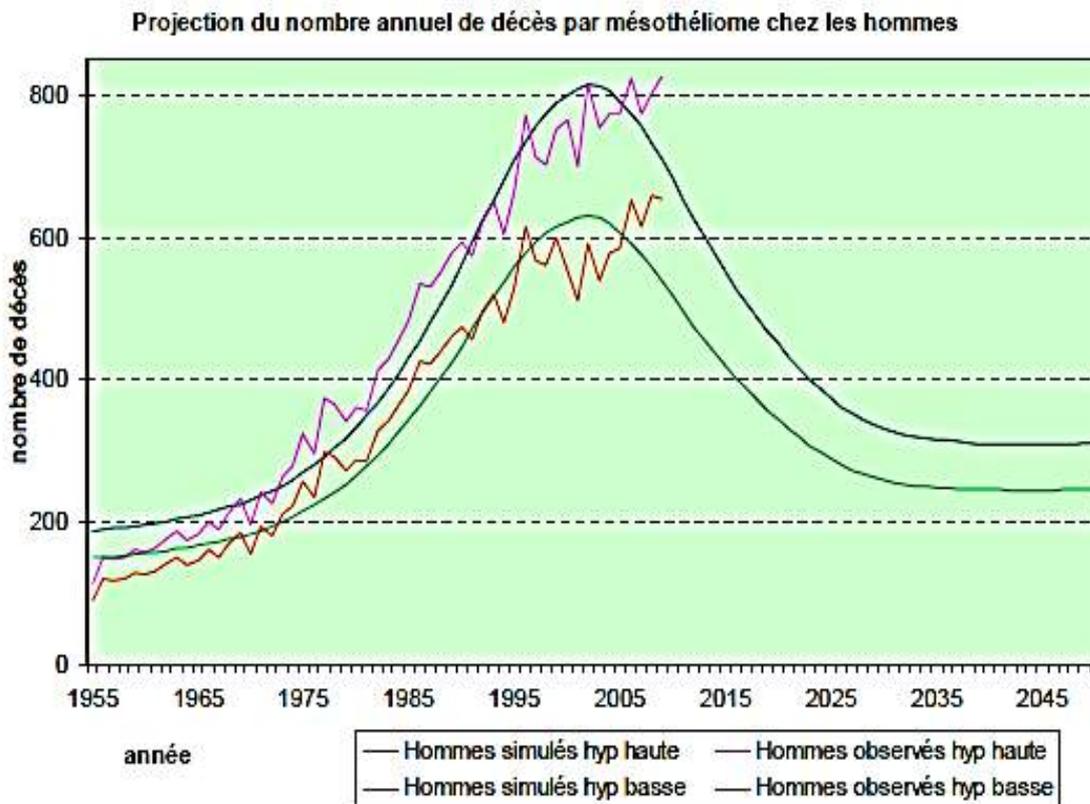


Figure 6 : Nombre de décès annuel par mésothéliome, observés et projetés, chez l'homme de 1955 jusqu'en 2050 (Goldberg et Rey 2012).

I.D.3. Mortalité en France

Goldberg et Rey, estiment à 25 à 36 milliers de décès par mésothéliome en France entre 1955 et 2010 en se basant sur les données du centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (CépiDc), l'Institut national de la Santé et de la Recherche médicale (Inserm) et le PNSM (Tableau 2). Ils remettent ainsi en cause le pronostic de la progression continue de l'incidence jusqu'en 2025 en proposant une modélisation alternative. D'après leurs travaux publiés par l'InVS en 2013, le pic de mortalité par mésothéliome pleuraux semble avoir été atteint en France au début des années 2000, avec entre 850 et 1 100 décès annuels (631 à 815 décès annuels chez les hommes et de 245 à 310 chez les femmes), et d'une persistance de l'épidémie jusqu'en 2025.

Néanmoins, même si la mortalité commence à décroître chez l'homme de par la baisse d'incidence, et devrait se stabiliser vers 2030 (au même niveau que dans les années 70) (Figure 6), il est attendu 18 à 25 milliers de décès par mésothéliome d'ici 2050 en France (Goldberg and Rey, 2012).

Malgré les avancées thérapeutiques récentes, le pronostic du MPM reste très défavorable. Les manifestations cliniques étant peu spécifiques et survenant à un stade avancé de la maladie, le diagnostic est établi tardivement. Les patients ont une médiane de survie globale (SG) faible de 12 à 24 mois pour une maladie localisée et seulement de 8 à 14 mois pour une maladie avancée (Brosseau *et al.*, 2017; Nelson *et al.*, 2017) et présentent un taux de survie à 5 ans de moins de 10%. La survie est par ailleurs fortement influencée par le sous-type histologique.

Tableau 3: Marqueurs immunohistochimiques (IHC) capitaux pour le diagnostic du MPM.

Marqueurs positifs	Marqueurs négatifs
Calrétinine	TTF-1 (Thyroïd transcription factor-1)
Cytokératine 5/6	ACE
WT1 (Wilms tumor gene-1) marquage nucléaire	Ber EP4 (positivité focale dans 20% des cas)
EMA (Antigène membranaire anti-épithélial) marquage membranaire intense	CD34
Pan-cytokératine KL1 ou AE1-AE3	Bcl2
	Récepteurs au œstrogènes et à la progestérone

Les cibles recherchées en IHC varient selon le type histologique (épithélioïde *vs* sarcomatoïde), la topographie de la tumeur (pleural *versus* péritoneal) et le type de tumeur à considérer pour le diagnostic différentiel (adénocarcinome, carcinome épidermoïde, mélanome malin, tumeur fibreuse solitaire).

Pour établir le diagnostic du MPM, l'utilisation de deux marqueurs positifs et de 2 marqueurs négatifs (favorisant le diagnostic d'adénocarcinome ou de sarcome) est recommandée.

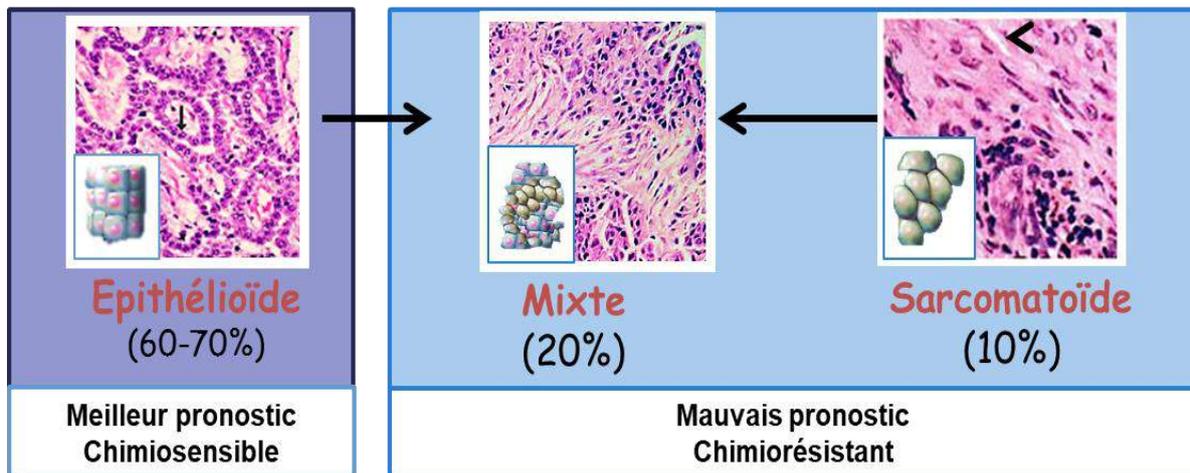


Figure 7 : Les types histologiques du mésothéliome pleural malin.

Le type épithélioïde est de meilleur pronostic et chimiosensible alors que les types sarcomatoïdes et mixtes sont de mauvais pronostic et chimiorésistants.

I.E. Classification histopathologique du MPM

Le diagnostic histologique du mésothéliome est complexe et difficile. Il s'appuie sur une procédure standardisée et de confirmation par un panel "tumeurs rares", labellisé par l'INCa, d'experts en anatomopathologie : le groupe MESOPATH. Il repose sur l'analyse de plusieurs marqueurs immunohistochimique (Tableau 3) afin de distinguer d'une part un MPM de lésions pleurales bénignes, inflammatoire ou réactionnelles, et d'autre part de métastases pleurales d'un adénocarcinome pulmonaire ou extra-thoracique, ou encore d'un sarcome pour les sous-types sarcomatoïdes. La déclaration d'un mésothéliome et sa certification anatomopathologique sont devenus obligatoire en 2011.

La nouvelle classification de 2015, des tumeurs de la plèvre, par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) est basée sur des critères histopathologiques (Travis *et al.*, 2015). En effet, la tumeur peut prendre de nombreux aspects histologiques du fait de la grande plasticité morphologique des cellules mésothéliales pouvant mimer des cellules de types très différents, de la cellule épithéliale à sarcomateuse (Husain *et al.*, 2013) (Figure 7):

- **Le MPM épithélioïde représente 70% des mésothéliomes**, il est de meilleur pronostic et réputé plus chimio-sensible avec une médiane de survie de 14 mois (Wang *et al.*, 2017) . Le type épithélioïde est réparti en plusieurs variantes architecturales et cytologiques. Sur le plan architectural la forme épithélioïde possède un grand polymorphisme histologique avec des formes tubulo-papillaire, micropapillaire, acinaire, adénomatoïde, kystique ou encore solide. Les variantes architecturales ont peu ou pas d'implication pronostique alors que les variantes cytologiques, notamment avec les formes rhabdoïdes, déciduoïdes ou pléiomorphes, sont décrites dans certaines études comme de moins bon pronostic. Il est à noter que l'élévation des atypies nucléaires, des mitoses ou de l'index de prolifération sont des facteurs de mauvais pronostic (Kadota *et al.*, 2012).
- **Le MPM sarcomatoïde représente 10% des mésothéliomes**, il est de mauvais pronostic et chimio-résistant avec une médiane de survie globale d'à peine 5 mois (Wang *et al.*, 2017). Cette forme résulte de la prolifération de cellules fusiformes organisées en faisceaux enchevêtrés ou s'agencant au hasard. Le sous-type desmoplastique est une variante du type sarcomatoïde, très agressive mais rare représentant 2% des mésothéliomes et se caractérise par un aspect très fibreux, pauvre en cellules fusiformes.

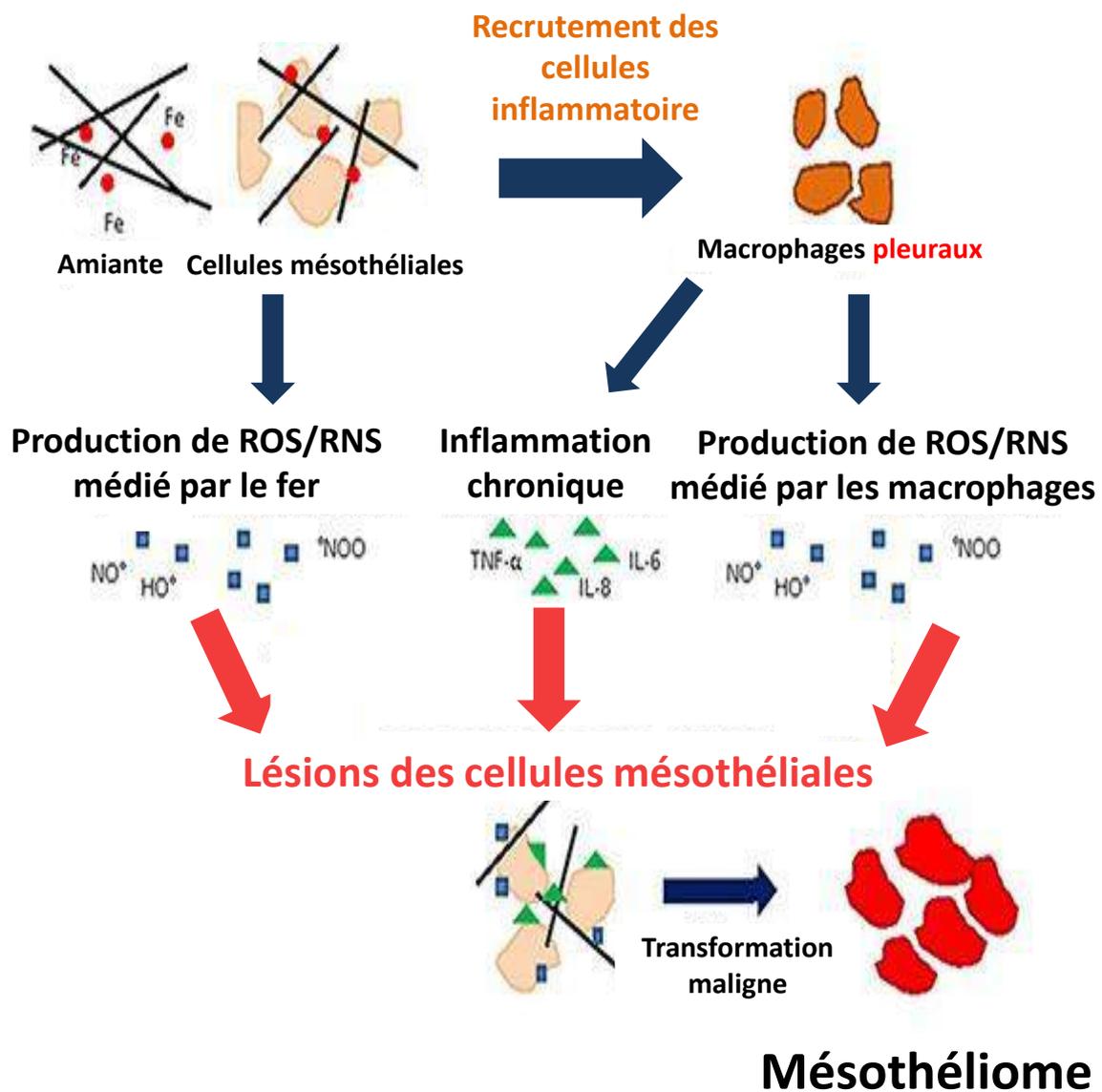


Figure 8: L'amiante entraîne des dommages cellulaires conduisant à un mésothéliome. Les cellules mésothéliales exposées à la production de ROS/RNS induite par le fer, les macrophages et les cytokines inflammatoires peuvent faire face à des lésions cellulaires et subir une transformation maligne entraînant un mésothéliome (d'après Benedetti *et al.*, 2015).

- Le MPM biphasique ou mixte représente 20% des cas, il est de moins bon pronostic que le sous-type épithéloïde mais meilleur que le sarcomatoïde avec une médiane de survie d'un peu plus de 10 mois (Wang *et al.*, 2017), l'importance de la composante sarcomatoïde étant associée au pronostic péjoratif. Pour considérer qu'un mésothéliome est biphasique, il faut que le pourcentage de chaque composante (épithéloïde et sarcomatoïde) représente au minimum 10% de la tumeur.

I.F. Caractéristiques moléculaires de la cancérogenèse pleurale

I.F.1. Dommages induits par les fibres d'amiante

Comme tous les cancers, le MPM résulte d'une perturbation de l'homéostasie cellulaire aboutissant à l'immortalisation et une prolifération incontrôlée, une dé-différenciation et l'acquisition d'un potentiel invasif par les cellules mésothéliales.

La carcinogenèse pleurale est un processus multi-étapes qui requière de nombreux changements génétiques avant que la transformation néoplasique ne soit complète et irréversible. A ce jour, les mécanismes exacts de la carcinogenèse induits par l'amiante ne sont pas encore établis avec précision. Les recherches des caractéristiques carcinologiques du MPM étant confrontées à certaines difficultés, dont l'absence de lésion précancéreuse clairement identifiée, si ce n'est des lésions d'hyperplasie mésothéliale bénignes parfois observées sur des biopsies de sujets exposés à l'amiante avec pleurésie bénigne récidivante, et surtout un temps de latence extrêmement long entre exposition à l'amiante et la survenue de la tumeur. Néanmoins, il est établi que les fibres inhalées migrent des alvéoles périphériques jusqu'à la cavité pleurale virtuelle, soit passivement soit après phagocytose par des macrophages, incapables de dégrader ces fibres et qui pour une raison non comprise actuellement, ne pourraient être éliminées ou drainées dans la circulation lymphatique. L'exposition continue à l'amiante à ce niveau entraînerait une réaction inflammatoire chronique, avec production chronique de ROS (Reactive Oxygen Species) induisant des mutations de l'ADN ou des altérations épigénétiques responsable d'une croissance incontrôlée, d'une résistance à l'apoptose et donc de la survenue d'un MPM (Dianzani *et al.*, 2006; Kumar-Singh *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2007) (Figure 8).

Récemment, l'instillation de longues fibres d'amiante (ou de longs nanotubes de carbone) dans la cavité pleurale de souris non immunodéprimées sur de longues périodes de temps (jusqu'à 6 mois ou 1 an) a permis de reconstituer expérimentalement les étapes morphologiques et moléculaires aboutissant à la formation d'un mésothéliome en tous points semblables à ceux

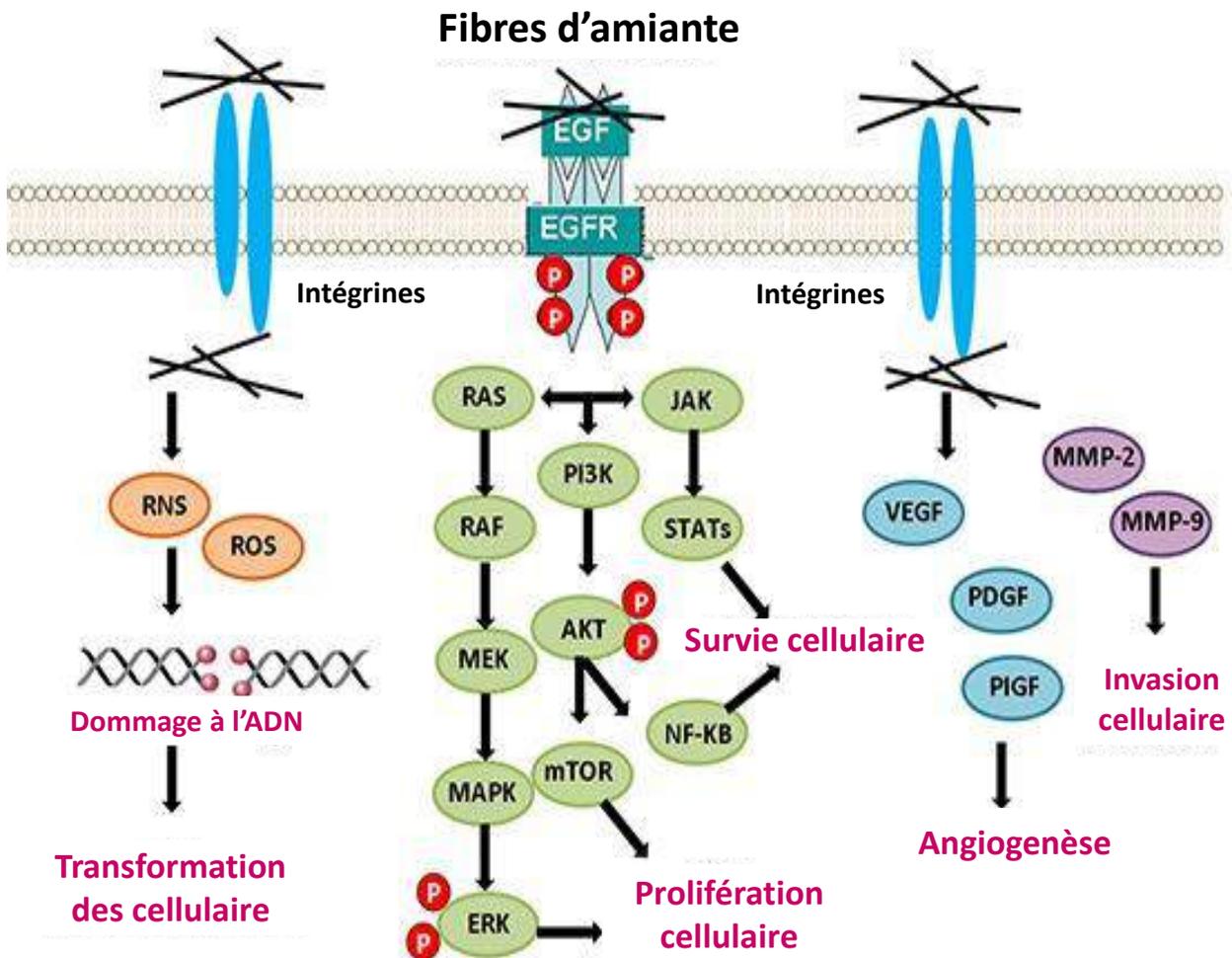


Figure 9 : Activation de voies de signalisation intracellulaires par interactions directes de l'amiante au récepteur de l'EGF ou aux intégrines.

La fixation des fibres d'amiante à l'EGFR et/ou aux intégrines active des voies de signalisation cellulaires, qui régulent l'expression de gènes et le devenir de la cellule conduisant à la transformation cellulaire, à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses, à l'angiogenèse et à l'invasion. L'interaction directe avec le récepteur à EGF active la voie Ras-Raf et les ERK (Extracellular signal- regulated kinase), qui contrôlent l'expression et l'activité transcriptionnelle des membres de la famille Fos de la protéine activatrice-1 (AP-1). L'activation de la PI3K/AKT favorise la survie cellulaire par NF-κB. (d'après Benedetti *et al.*, 2015)

observés chez l'homme, avec l'apparition de lésions inflammatoires chroniques, riches en lymphocytes T et fibroblastes (Chernova *et al.*, 2017). A 6 mois post-injection apparaissaient des lésions d'hyperplasie mésothéliale avec une augmentation du marquage Ki67, cependant l'ADN de ces cellules était enrichi en 8-OH-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG), un marqueur de stress oxydatif bien connu. Sur 32 souris exposées à l'amiante (25 à 50 µg) dans cet article, 3 ont développé un mésothéliome 18 à 20 mois post-injection (Chernova *et al.*, 2017).

L'hypothèse privilégiée pour expliquer les mécanismes par lesquels l'amiante induit le MPM est donc une **action indirecte** des fibres d'amiante provoquant une inflammation chronique de la plèvre pariétale recrutant des phagocytes (Lee *et al.*, 2007) (Figure 8). La phagocytose incomplète des fibres par les macrophages générerait des ROS et de l'azote mutagènes qui entretiendraient l'inflammation et altèreraient la molécule d'ADN des cellules mésothéliales, avec l'apparition d'aberrations chromosomiques et une altération des mécanismes de réparation de l'ADN (Carbone *et al.*, 2012; Dianzani *et al.*, 2006). En réponse à l'inflammation, les cellules mésothéliales sécrèteraient de nombreuses cytokines et facteurs de croissance stimulant une néo-angiogenèse et la prolifération cellulaire pouvant rendre compte de la croissance et dissémination des cellules tumorales. La sécrétion de TNF α (Tumor necrosis factor α) aboutit à l'activation de la voie NF κ B (Nuclear factor-kappa B) qui joue un rôle dans la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose, augmentant ainsi le nombre de cellules mésothéliales qui survivent à l'exposition à l'amiante (Benedetti *et al.*, 2015). La sécrétion d'IL6 (Interleukine 6) a aussi été rapportée récemment (Chernova *et al.*, 2017).

Une **action directe** de l'amiante par des interactions physiques avec l'ADN reste discutée mais il semble que les fibres d'amiante puissent provoquer directement des cassures et des lésions de l'ADN responsables de délétions et surtout d'une mauvaise dysjonction des chromosomes pendant la mitose, ce qui entraînerait à terme des anomalies chromosomiques structurales et numériques (Huang *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2007).

En plus de leur action sur l'ADN des cellules mésothéliales, les fibres d'amiante activeraient plusieurs voies de signalisation (STAT3, MAPK, PI3K/AKT/mTOR) intervenant dans la survie des cellules mésothéliales en aval de récepteurs tyrosine kinase tel que le récepteur à l'EGF, à l'HGF, ou en aval des intégrines (Figure 9). Des modifications épigénétiques précoces sont aussi décrites telles que la phosphorylation des histones H3 (Chernova *et al.*, 2017).

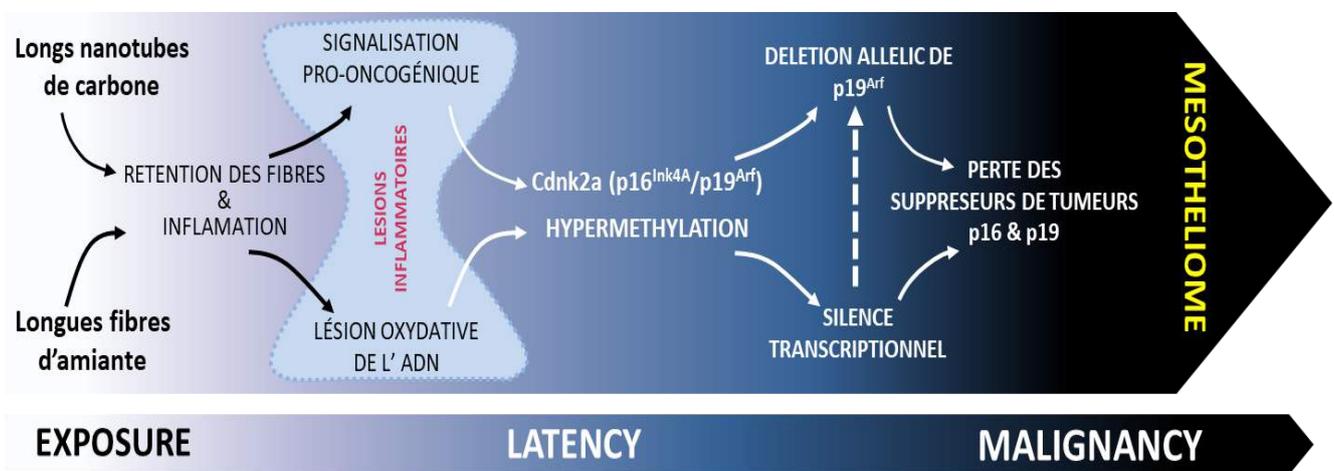


Figure 10 : Les longues fibres de nanotube de carbone entraînent un mésothéliome à l’instar des longues fibres d’amiante car altèrent l’expression du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A (Ink4a/Arf)*.

Représentation schématique de la séquence des événements dans les plèvres d’animaux exposés aux longues fibres d’amiante ou aux longues fibres de nanotube de carbone montrant une similitude dans la progression de la maladie induite par ces deux types de fibres longues qui reproduit le développement du mésothéliome chez l’homme (Chernova *et al.*, 2017).

I.F.2. Les altérations génétiques récurrentes du MPM

Le modèle expérimental développé par Chernova *et al.*, a permis de mieux comprendre la carcinogénèse par étapes de la cellule mésothéliale en réponse à l'agression des fibres longues d'amiante, ou de nanotubes de carbone synthétique, l'élément essentiel pour induire cette carcinogénèse étant manifestement la longueur des fibres incriminées (Figure 10). En injectant ces longues fibres dans la cavité pleurale des souris, et en échantillonnant la plèvre à de multiples temps, pendant les 24 mois de suivi de ces souris, puis en analysant les altérations histologiques et moléculaires contemporaines, les auteurs nous donnent une idée assez précise, de la cascade d'évènements pro-tumorigéniques. Dans un premier temps les fibres longues (et pas des fibres plus courtes) induisent des lésions pleurales inflammatoires avec un afflux de cellules macrophagiques et leucocytaires puis fibroblastiques. Dans ces lésions, les cellules mésothéliales apparaissent proliférer avec une augmentation des cellules Ki67 positives, et une activation des voies des signalisations SRC, MAPK/ERK, STAT3 et mTOR, cependant une augmentation d'IL6 dans le tissu pleural est retrouvée par immunohistochimie (IHC). La première altération moléculaire retrouvée est épigénétique avec une hyper-phosphorylation des histones H3 dans ces cellules. En parallèle des lésions oxydatives de l'ADN de ces cellules sont mises en évidence à 3 et 6 mois post-instillation sous la forme d'une augmentation de résidus 8-OH deoxyguanosine. Sur les 32 animaux exposés aux longues fibres minérales, 3 ont développé un mésothéliome épithélioïde typique à 18 mois post-instillation. Comme dans les mésothéliomes humains ces tumeurs ont perdu l'expression des produits p16 et p19^{Arf} du gène *Cdkn2a* avec une perte du locus p19^{Arf} au niveau ADN, le locus de p16 n'étant pas perdu, et une méthylation du promoteur *Cdkn2a* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A). La perte d'expression protéique p16 et p19^{Arf}, comme la méthylation du promoteur du gène, surviennent spécifiquement dans les lésions inflammatoires précancéreuses des souris qui finissent par développer un mésothéliome mais pas chez les souris qui n'en développeront pas, témoignant du caractère précoce de cette altération dans la carcinogénèse pleurale. Par contre dans ce modèle, les auteurs n'ont pas retrouvé d'altération du gène *NF2/merlin* pourtant fréquemment altéré dans les mésothéliomes humains (Chernova *et al.*, 2017).

Un certain nombre d'altérations génétiques récurrentes sont ainsi aujourd'hui répertoriées permettant de mieux caractériser ces lésions d'un point de vue moléculaire. Ces altérations génétiques affectent l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs (des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire, décrits comme freinant le cycle cellulaire et favorisant

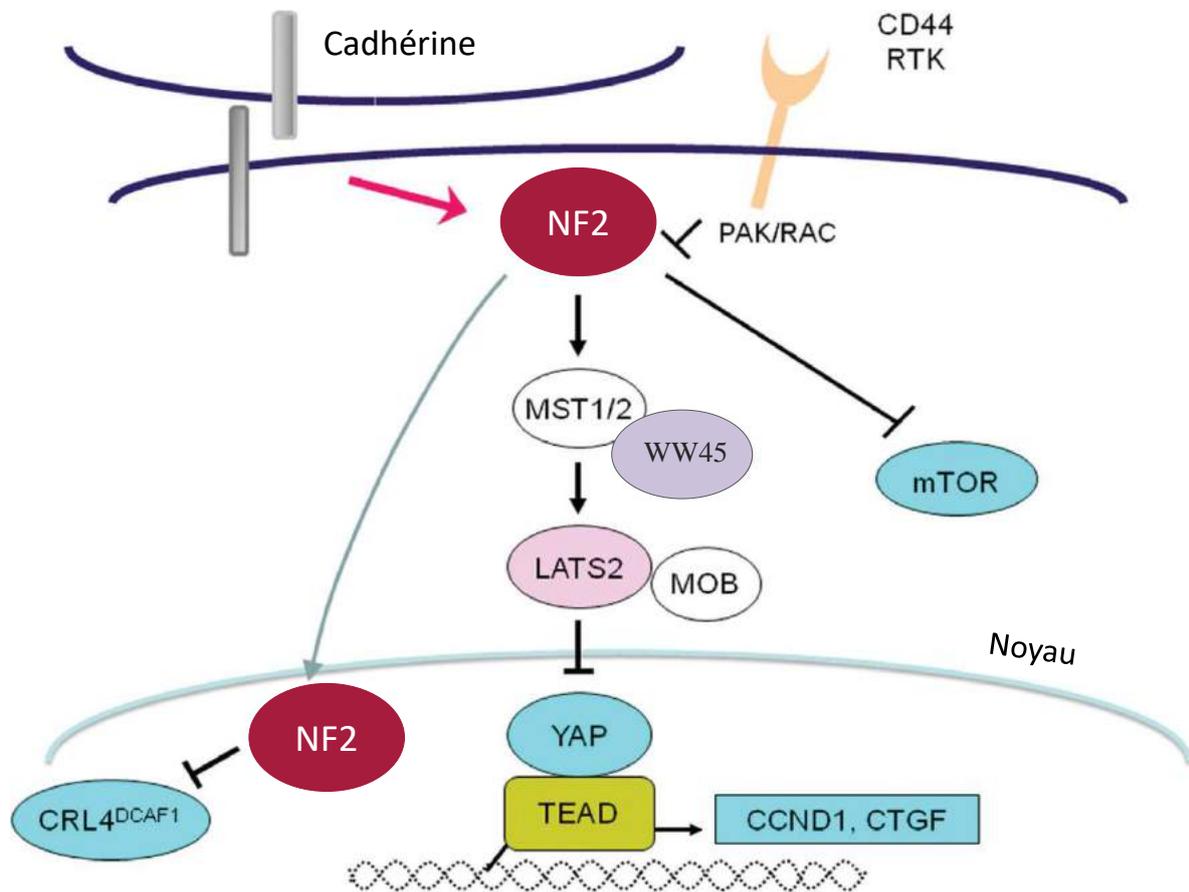


Figure 11: Cascade de signalisation NF2-Hippo.

Des signaux provenant d'un environnement extracellulaire, transduits *via* un contact cellule-cellule (cadhérine), un contact cellule-matrice (CD44) ou des récepteurs aux facteurs de croissance (RTK), affectent l'activité de NF2. NF2 régule la cascade de signalisation Hippo en supprimant l'activité du coactivateur transcriptionnel YAP.

NF2 régule également la voie de signalisation mTOR dans les cellules mésothéliales (d'après Sekido, 2013).

l'apoptose). Ces **gènes suppresseurs de tumeurs** étant récessifs sont inactivés par délétion du chromosome portant leur locus et/ou de mutations ponctuelles et/ou hyperméthylation de leurs promoteurs, ces altérations devant porter sur les 2 allèles.

Les nombreux évènements oncogéniques typiques d'autres tumeurs (mutations des gènes *KRAS*, *BRAF*, *EGFR* et *PIK3CA*) sont absents dans le MPM et la perte des gènes suppresseurs de tumeurs plus que l'activation des oncogènes émerge comme étant une signature moléculaire du MPM (Andujar *et al.*, 2016; Hylebos *et al.*, 2016), les altérations récurrentes du MPM sont en effet :

- des hyperméthylations de promoteur de gènes suppresseurs de tumeurs (*RASSF1A* (Ras Association Domaine Family 1 isoform A), *p16*, *WIF1* (Wnt Inhibitory Factor 1)),
- des mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs (*NF2* (Gène de la Neurofibromatose de type 2), *BAP1*),
- des mutations de *c-Met*, siégeant en dehors du domaine kinase sur les domaines juxta-membranaire et extra-cellulaire semaphorine. Des amplifications géniques de bas niveau ont également été décrites, mais leur signification et rôle oncogénique sont incertains (Jagadeeswaran *et al.*, 2006).

I.F.2.a. L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

➤ **NF2 (merlin)**

Le gène *NF2* code pour une protéine « merlin » de 595 acides aminés présentant une forte homologie de séquence avec les protéines de la famille des ERM (ezrine/radixine/moésine). Cette protéine joue un rôle dans la dynamique et la structure de la surface cellulaire en reliant les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine. NF2 régule ainsi l'interaction des cellules mésothéliales avec les éléments de la matrice extracellulaire (MEC), et des cellules mésothéliales entre elles, puisque celle-ci stabilise les jonctions intercellulaires. En stabilisant ces jonctions, NF2 contribue à l'établissement et au maintien de la polarité apico-basale des cellules mésothéliales, polarité précocement perdue au cours du processus de transformation cellulaire. Par son interaction fonctionnelle avec des protéines d'adhésion telles que le CD44 (récepteur à l'acide hyaluronique), la kinase des plaques d'adhésion focale : FAK (Focal Adhesion Kinase) (Poulikakos *et al.*, 2006) ou le récepteur c-Met de HGF, NF2 réprime plusieurs cascades de signalisation incluant la voie mTOR (Target Of Rapamycin) et active la voie de signalisation Hippo (Sekido, 2013). La voie de signalisation Hippo se compose de

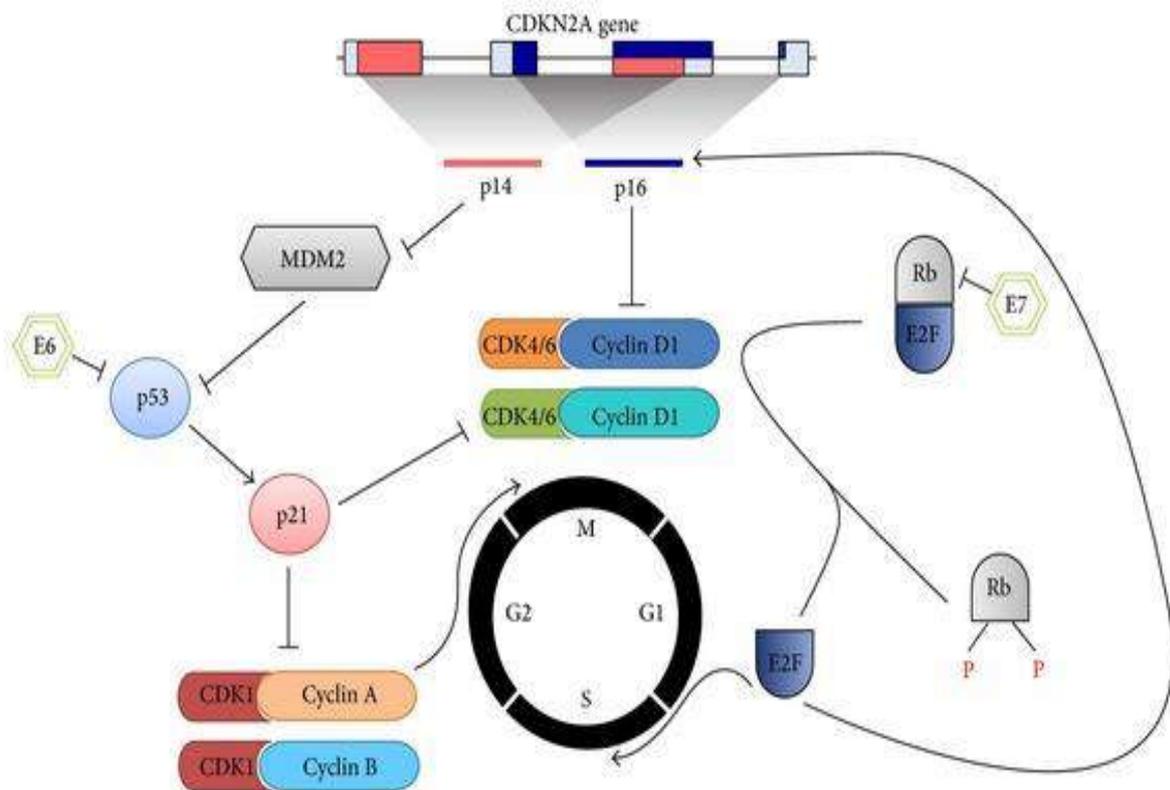


Figure 12 : Mécanisme d'action des gènes suppresseurs de tumeur *p16* et *p14* (*ARF*) sur le cycle cellulaire.

Le gène *CDKN2A* code, par un épissage alternatif, pour deux répresseurs du cycle cellulaire *p16* et *p14* (*Arf*). La séquestration de *CDK4/6* par *p16* garde la protéine *Rb* dans un état actif non phosphorylé. En l'absence de *p16*, *CDK4/6* fixe la cycline *D* et phosphoryle la protéine *Rb* qui libère alors *E2F*, permettant la transition de la phase *G1* à la phase *S*

La protéine *p14* séquestre *MDM2*. En son absence, *MDM2* induit l'ubiquitination de *p53* et sa dégradation par le protéasome. La dégradation de *p53* provoque la perte du contrôle du cycle cellulaire. La perte de *CDKN2A* contribue à la cancérogenèse (Al-Kaabi *et al.*, 2014).

kinases qui ont en charge de contrôler l'activité des effecteurs terminaux de cette voie que sont YAP (Yes-associated protein) et son paralogue TAZ (Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif) (cette voie sera décrite en détail dans la partie III, section introduction). L'inactivation de la signalisation NF2-Hippo (Figure 11) induit ainsi l'activation de YAP, responsable de la transcription de plusieurs gènes favorisant la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. Enfin, NF2 participe à la régulation de plusieurs processus cellulaires dont l'invasion, la prolifération et la survie des cellules mésothéliales.

Les mutations du gène *NF2* (locus 22q12) ont été les premières altérations moléculaires mises en évidence dans le MPM (Bianchi *et al.*, 1995; Sekido *et al.*, 1995). Ces mutations sont fréquentes, elles sont retrouvées chez 14 à 19% des cas de MPM (Bueno *et al.*, 2016; De Rienzo *et al.*, 2016; Lo Iacono *et al.*, 2015). Elles sont soit **des délétions** de toute ou une partie du 22q, soit **des substitutions** conduisant à des protéines NF2 tronquées et inactives, et à la dérégulation de tous les processus cellulaires que NF2 contribue à contrôler (Thurneysen *et al.*, 2009).

➤ p16 et p14 (gène *CDKN2A*)

Le gène *CDKN2A* code, par un épissage alternatif, pour deux répresseurs du cycle cellulaire : p16 et p14 (*ARF*), participant au contrôle des protéines Rb et p53 (Lee *et al.*, 2007) (Figure 12). La protéine p16 est un inhibiteur physiologique des kinases dépendantes des cyclines D1 et E contrôlant la transition de la phase G1 à S (point de contrôle) du cycle cellulaire par son interaction avec la kinase CDK4 (Cycline dependent Kinase 4) et la phosphorylation de la protéine Rb. Ainsi la perte d'expression de p16 conduit à l'inactivation de la protéine Rb, essentielle au contrôle du cycle cellulaire (Sekido, 2013). Les altérations du gène suppresseur de tumeur *p16*, décrites fréquemment dans le MPM sont des **mutations ponctuelles** (2%), de **méthylation du promoteur** (10%), associées à des **pertes d'hétérozygotie** du locus en 9p21 voir à des délétions homozygotes (70%) (Campbell *et al.*, 2013).

La protéine p14^{ARF} participe également au contrôle du cycle cellulaire, en interagissant avec HDM2 (Human double minute 2 homolog) le régulateur négatif de p53. Sa perte d'expression aboutit à la dégradation de p53 par le protéasome, liée à son interaction avec HDM2. La séquence codante de p14 est délétée dans 62% des MPM, soit 55% des formes épithélioïdes, 65% des sarcomatoïdes et 71% des biphasiques. Ces délétions sont corrélées avec une survie globale plus courte et souvent associées avec les types non épithélioïdes (De Rienzo *et al.*, 2016). Il faut noter que presque systématiquement la perte ou inactivation de *p16* est associée à la perte ou inactivation de *CDKN2A/p14*.

➤ **BAP1**

BAP1 est une enzyme de déubiquitination nucléaire agissant sur la lysine 119 de l'histone H2A, impliquée dans la régulation des gènes cibles importants dans la transcription, la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation cellulaire (Hebert *et al.*, 2017; Pillappa *et al.*, 2017). L'une des conséquences essentielles de la perte de fonction de BAP1 est une augmentation d'expression de la sous-unité EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) du complexe de répression de la transcriptionnel Polycomb 2 (PRC2), l'inhibition pharmacologique de EZH2 induisant l'apoptose des cellules mesothéliales dépourvues de BAP1 (LaFave *et al.*, 2015).

L'inactivation par **mutation somatique de BAP1** sur le chromosome 3p21 a été identifiée dans 21% des cas de MPM (De Rienzo *et al.*, 2016; Hylebos *et al.*, 2016). Des **mutations germinales** sont également décrites (Ladanyi *et al.*, 2012; Testa *et al.*, 2011) responsables d'un syndrome de susceptibilité au cancer. En effet, certaines familles présentent une incidence élevée de MPM après une exposition à l'amiante qui s'explique par la perte d'un des allèles induite par l'amiante et le deuxième allèle est inactivé par une mutation germinale (Betti *et al.*, 2015; Carbone et Yang, 2017). Ces mutations sont souvent des mutations STOP conduisant à l'arrêt de la transcription de *BAP1* donc de la synthèse de la protéine BAP1, ou des mutations siégeant sur la séquence permettant à la protéine d'entrer dans le noyau des cellules (Campbell *et al.*, 2013). Le "syndrome familial BAP1" est aussi caractérisé par d'autres tumeurs fréquentes dans ces familles, mélanomes uvéaux ou cancer rénaux à cellules claires. Cependant dans le MPM, les mutations *BAP1* sont le plus souvent somatiques, les formes familiales restant minoritaires et rares.

➤ **p53**

La protéine p53 est un facteur de transcription, décrite comme le gardien du génome indispensable au maintien de l'intégrité cellulaire, en contrôlant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, le déclenchement de l'apoptose et la réparation de l'ADN. Dans la cellule normale, très peu de p53 est détectée du fait de sa dégradation par le protéasome après liaison avec l'enzyme HDM2, une ubiquitine ligase, et de sa courte demi-vie, de 20 minutes à peine. En revanche, en condition de stress (lésion de l'ADN, anomalie du cycle cellulaire et/ou perturbation de métabolisme cellulaire), cette interaction p53/HDM2, est abolie conduisant à la stabilisation de p53 et à l'arrêt de la division cellulaire (en G1/S et G2/M) pour la réparation de l'ADN. Si les dommages ne sont pas

réparables, la cellule entre en apoptose après l'activation d'autres gènes apoptotiques tels que Bax.

La **mutation de p53** est la plus commune des anomalies génétiques répertoriées dans plus de la moitié des cancers chez l'Homme. Dans le MPM, la mutation de p53 sur le locus 17p13 est un phénomène rare (5-10% selon les études) par rapport aux autres cancers (Bueno *et al.*, 2016; De Rienzo *et al.*, 2016; Jean *et al.*, 2012). Pourtant l'accumulation de protéine p53 dans le noyau des cellules mésothéliales malignes est retrouvée dans plus de 50% des cas. Cette accumulation a été imputée à la possible interaction avec l'antigène T du virus SV40 (Hopkins-Donaldson *et al.*, 2006), mais l'oncogénéicité de ce virus dans le MPM est désormais largement contestée. Plus probablement, cette stabilisation de la protéine serait épigénétique (phosphorylation ou acétylation) en réponse à l'inflammation chronique et la libération de ROS sous l'effet des fibres d'amiante. La rareté des mutations p53 est à relier à la charge mutationnelle relativement faible de ces tumeurs (en comparaison aux cancers bronchiques par exemple), témoignant d'une certaine stabilité génétique (Bueno *et al.*, 2016), l'équipe de M. Meyerson a quantifier à 0,79 mutations/mégabase en moyenne cette charge mutationnelle (Guo *et al.*, 2015). Il convient de souligner que Bueno et collaborateurs, ont aussi analysé (*in silico*) dans leur article sur le séquençage NGS (Next Generation Sequencing) des exomes de mésothéliomes, l'immunogénéicité potentielle des mutations retrouvées sur NF2, BAP1 et p53. Ils ont montré que ces mutations entraînaient la formation de néo-épitopes à même de lier fortement ($IC_{50} < 50nM$) les molécules HLA de classe I, ce qui rend sans doute compte des premiers résultats favorables des essais d'immunothérapie dans le mésothéliome alors que la charge mutationnelle est globalement faible.

➤ WIF1

La liaison de la glycoprotéine Wnt à son récepteur (Frizzled) active la cascade de signalisation intracellulaire Wnt/ β caténine conduisant à la stabilisation et l'accumulation de β -caténine qui entre alors dans le noyau et se lie aux facteurs de transcription TCF/LEF pour réguler la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans le MPM des altérations de la **voie de régulation Wnt1 et Wnt2** (Wingless Integrase) sont décrites, conduisant à une fréquente surexpression des protéines Wnt dans les cellules tumorales (Fox *et al.*, 2013). Le gène *WIF1*, régulateur négatif de la protéine Wnt est en effet fréquemment inactivé par **hyperméthylation** de son promoteur dans le MPM, favorisant ainsi l'activation de cette voie de signalisation et une prolifération mésothéliale non contrôlée (de Assis *et al.*, 2014; Batra *et al.*, 2006; Inai, 2010).

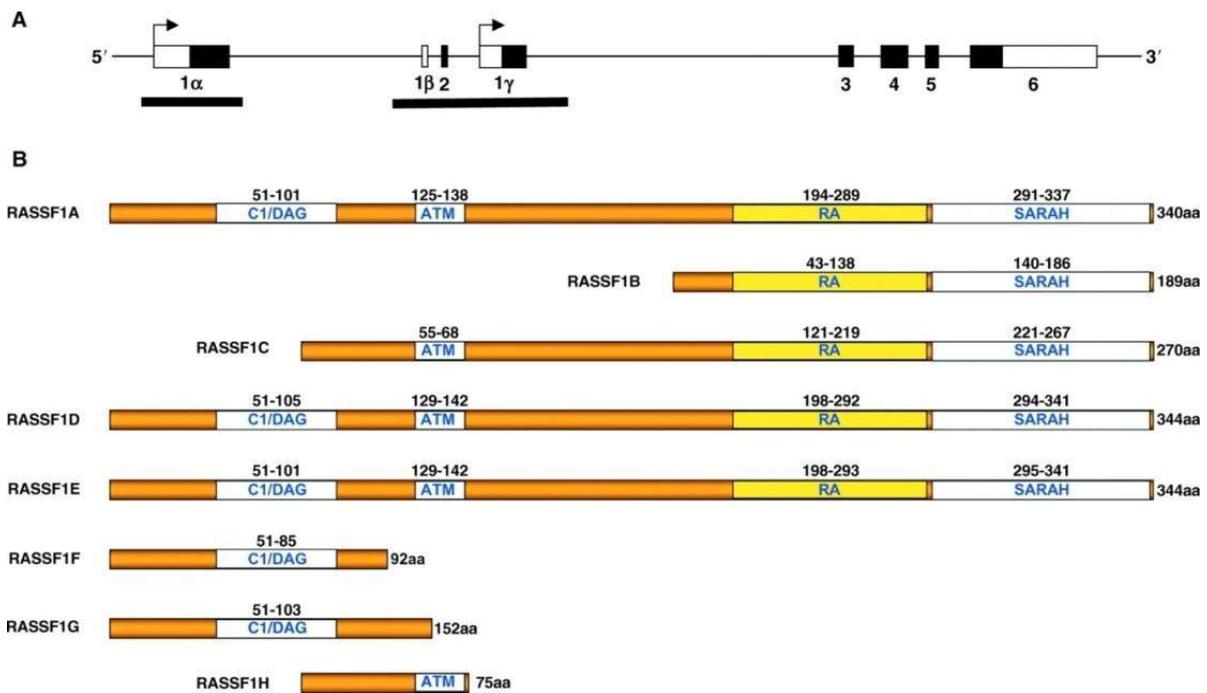


Figure 13 : Représentation schématique des 8 isoformes de *RASSF1*.

A) La séquence du gène *RASSF1* ; B) Les différentes protéines codées par le gène *RASSF1* obtenues selon le promoteur utilisé et l'épissage effectué (Donninger *et al.*, 2007).

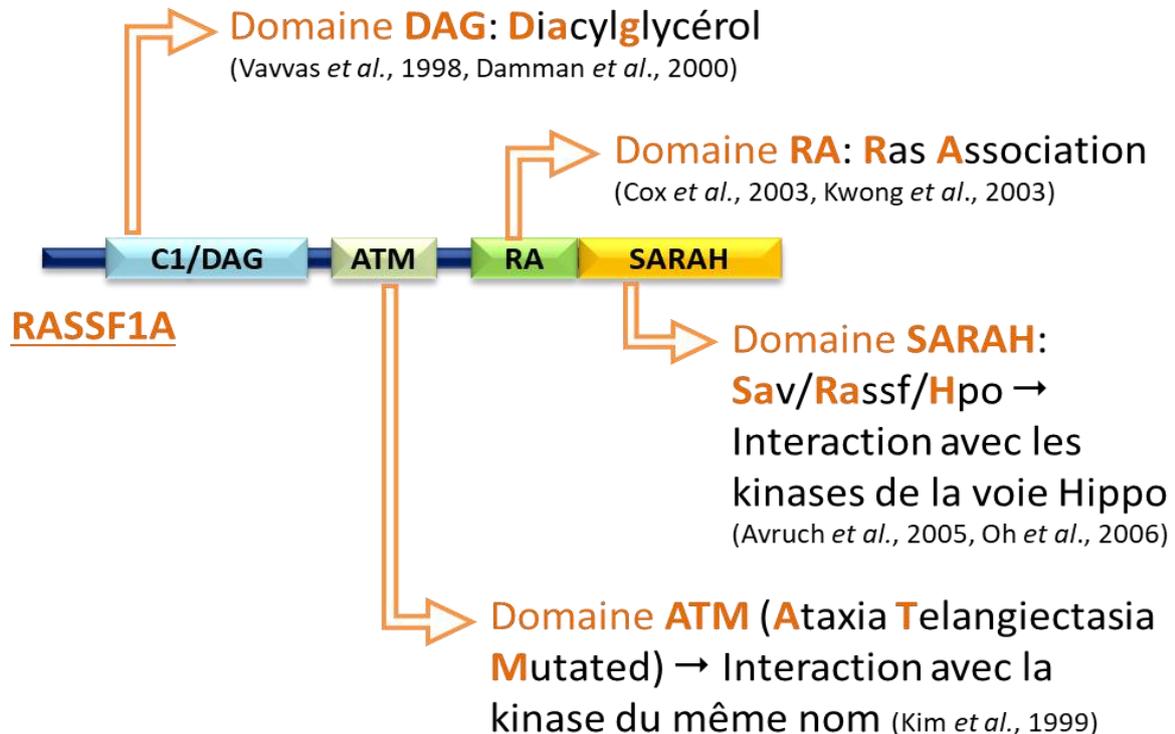


Figure 14 : Les différents domaines d'association protéine-protéine de RASSF1A.

RASSF1A est une protéine d'échafaudage moléculaire qui, en plus du domaine RAS qu'elle porte et qui la caractérise, contient de nombreux domaines d'association comme le domaine SARAH (SALvador, RASSF1, Hippo), ATM et C1/DAG.

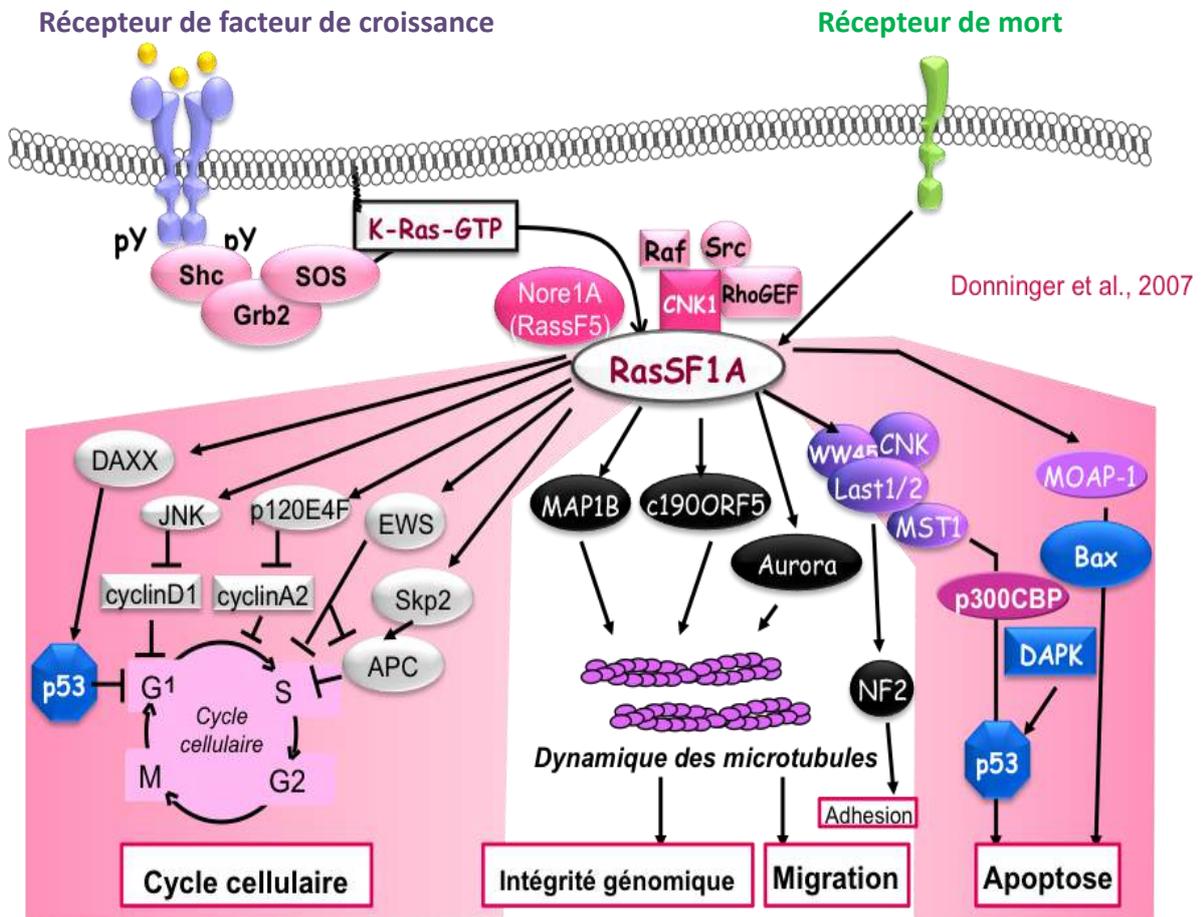
➤ SETD2, SETDB1 et SETD5

Ces gènes régulent la conformation des histones, dont l'activité transcriptionnelle sont fréquemment mutés dans les mésothéliomes, dans les deux grandes études de séquençage génomique massivement parallèles et de RNA-seq (Bueno *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2016), avec selon les programmes de prédiction structure/fonction, un impact fonctionnel quasi-certain. Ils codent pour des histones-méthyltransférases et seraient mutés dans 10 à 15% des mésothéliomes avec des mutations perte de fonction, ou des mutations non-sens (STOP), les rangeant dans la classe des gènes suppresseurs de tumeurs mutationnelle.

➤ RASSF1A

RASSF1A appartient à une superfamille de protéines présentant de fortes homologies de séquence pour un domaine de liaisons aux protéines Ras (Ras association domaine family), comprenant 10 membres : RASSF1 à 10. Le premier membre identifié chez l'homme est RASSF1, codé par un gène localisé sur le bras court du chromosome 3, mesurant 11Kb et constitué de 8 exons. L'épissage alternatif et l'utilisation des deux promoteurs de transcription (distance d'environ 3,5Kb) permettent la synthèse de 8 variants: RASSF1A à H (Donninger *et al.*, 2007) (Figure 13). Le variant RASSF1A code pour une protéine de 39 kDa possédant de nombreux domaines d'association (Figure 14) :

- un domaine **RA** (Ras association) s'étend des acides aminés (AA) 194 à 289, lui permettant d'interagir avec la protéine Ras activée sous forme liée au GTP, le plus souvent après stimulation d'un récepteur tyrosine-kinase (RTK), parmi ceux les plus exprimés par les cellules mésothéliales tumorales tels que le EGFR, le PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) ou le récepteur c-Met à l'HGF (HGFR).
- un motif C-terminal **SARAH** (SAlvador, RASSF1, Hippo), s'étend de l'AA à 291 à 337, lui permettant des interactions avec les membres de la voie de signalisation Hippo, dont l'adaptateur SAV/WW45 et la kinase MST1/Hippo.
- un domaine **ATM** (ataxie telangiectasie mutant) s'étend de l'AA 125 à 138, potentiellement phosphorylable par la kinase du même nom, en réponse à des dommages de l'ADN (cassures simple et double brins).
- un domaine **CI/DAG** (de l'AA 51 à 101) qui lui permet de lier le diacylglycérol.



Donninger et al., 2007

Figure 15 : Les différents partenaires de RASSF1A dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire.

RASSF1A interagit, avec P120(E4F) et JNK qui stoppent *via* les cyclines A2 et D1 le cycle cellulaire en phase G1/S et MOAP1 et CNK pour réguler l'apoptose. Localisée au niveau des microtubules, RASSF1A se lie aux protéines associées aux microtubules (MAPs) pour les stabiliser. En régulant leur polymérisation, elle contrôle le déroulement de la mitose. RASSF1A contrôle également l'intégrité génomique et la migration *via* son interaction avec les microtubules ainsi que l'adhésion cellulaire (adapté de Donninger *et al.*, 2007).

RASSF1A ne possède aucune activité enzymatique propre mais grâce à ses domaines d'interaction, interagit avec près de 50 partenaires différents, et édifie des échafaudages moléculaires complexes lui permettant de participer au contrôle du bon déroulement du cycle cellulaire, de la mort cellulaire programmée, de la stabilité génique et de l'adhésion/migration cellulaire (Agathangelou *et al.*, 2005, Donniger *et al.*, 2007) (Figure 15).

RASSF1A s'avère ainsi être l'un des principaux régulateurs du phénotype épithélial (Dubois *et al.*, 2016). Des travaux réalisés au sein de notre groupe ont en effet démontré que RASSF1A permet le maintien du phénotype épithélial des cellules bronchiques humaines, et qu'altérer cette voie dans ce modèle cellulaire provoque *i)* une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et *ii)* l'acquisition d'un phénotype migratoire (migration 2D, 3D, invasion, migration trans-endothéliale) (Dubois *et al.*, 2016). RASSF1A maintient ce phénotype épithélial en régulant l'activité des kinases de la voie Hippo et de leur effecteur terminal YAP (Dubois *et al.*, 2016, Thèse de Maureen Keller).

Dérégulée, la voie RASSF/Hippo est souvent impliquée dans la genèse des processus tumoraux dont ceux conduisant au MPM (Fausti *et al.*, 2012; Gomez *et al.*, 2014). **L'hyperméthylation du promoteur de gène RASSF1A** est décrite dans 20 à 32% des MPM selon les études avec perte de l'autre allèle sur le bras court du chromosome 3 (Destro *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2012), la délétion de tout ou une partie du locus 3p21.1 étant aussi liée à la perte de fonction de BAP1.

➤ **LATS2** (Large tumor suppressor 2)

Les protéines des familles RASSF1-6 régulent la voie de signalisation Hippo. En effet, *via* leur domaine SARAH, les protéines des familles RASSF1-6 peuvent se lier et par cette interaction changer la conformation spatiale des kinases MST1/2 (Mammalian Sterile 20-like Kinases 1/2), orthologues des gènes «hippo» chez la drosophile, en les activant. Sommairement, les kinases MST1/2 actives, s'auto-phosphorylent puis phosphorylent et activent alors les kinases LATS1/2, qui à leurs tour phosphorylent deux coactivateurs transcriptionnels, la protéine YAP, et son paralogue TAZ et les inactivent.

Dans le MPM, la voie Hippo peut être inactivée par la mutation de *LATS2* ce qui jouerait un rôle crucial dans la dérégulation de la prolifération cellulaire et/ou la survie dans les cellules mésothéliales (Miyanaga *et al.*, 2015; Murakami *et al.*, 2011). Des mutations par **délétion homozygote** de *LATS2* sur le chromosome 13q12 ont été décrites pour la première fois par l'équipe de Murakami. Ces mutations sont retrouvées dans 3,8 à 12% des cas de MPM (Bott

et al., 2011; Murakami *et al.*, 2011; Tranchant *et al.*, 2017) entraînant une activation aberrante de YAP qui se retrouve localisé dans le noyau où il peut activer la transcription de gènes cibles en interagissant avec d'autres facteurs de transcription car il est lui-même dépourvu de domaine de liaison à l'ADN.

Des mutations simultanées de *LATS2* et *NF2* sont également décrites dans 8% des MPM et sont de mauvais pronostic, ces co-mutants semblent être spécifiques à la carcinogenèse du MPM (Tranchant *et al.*, 2017). Or, la protéine NF2 normale est capable de promouvoir la séquestration (donc l'inactivation) de YAP au niveau des structures d'adhérence intercellulaires. Les mutations inactivatrices de *NF2* entraînent une augmentation du pool de YAP dans le cytoplasme, et en l'absence de phosphorylation (puisque *LATS2* est inactivé), sa translocation nucléaire. Bueno et coll. ont aussi décrit dans le mésothéliome, des mutations de *LATS1* et de *SAV* (Salvador ou encore WW45), une protéine chaperonne régulant négativement les kinases Hippo ce qui témoigne de l'importance de cette voie de signalisation dans cette tumeur (Bueno *et al.*, 2016).

I.F.2.b. L'activation mutationnelle d'oncogènes dans les mésothéliomes n'a pas été décrite à ce jour:

Il a néanmoins été décrit des mutations oncogéniques dans le promoteur de TERT (telomerase reverse transcriptase), qui ont été les premières mutations oncogéniques gain de fonction récurrentes identifiées dans MPM. (Tallet *et al.*, 2014).

Les altérations des RTK, rapportées dans le MPM (Bonelli *et al.*, 2017a; Sekido, 2013) sont essentiellement des surexpressions protéiques, sans amplification génique vraie, de c-Met et de l'EGFR (Brevet *et al.*, 2011; Kawaguchi *et al.*, 2009).

➤ **EGFR**

Le gène *EGFR*, localisé sur le chromosome 7 (locus en 7p12) code pour protéine transmembranaire. L'EGFR appartient à la famille des récepteurs tyrosine kinase HER/erbB qui comprend 4 protéines de structure moléculaire semblables capables de s'hétérodimériser. : HER-1/ErbB1, HER-2/ErbB2, HER-3/ErbB3 et HER-4/ErbB4.

La stimulation de ce récepteur par fixation du ligand entraîne son homo- ou l'hétérodimérisation puis son auto-phosphorylation (résidus tyrosine) puis l'activation des cascades MAP-Kinases mais aussi PI3K/AKT, ou encore JAK/STAT régulant l'apoptose, la prolifération, l'angiogenèse, l'invasion ou encore la formation de métastases.

La surexpression de l'EGFR a été décrite dans 50 à 95% des MPM (Bonelli *et al.*, 2017a; Destro *et al.*, 2006; Schildgen *et al.*, 2015). Des mutations activatrices de l'EGFR ne semblent pas présentes dans la population occidentale de patients avec mésothéliomes (Schildgen *et al.*, 2015). Des mutations des voies de signalisation en aval de l'EGFR ont été identifiées dans de rares publications dont la signification fonctionnelle est incertaine, et certaines ne pourraient être que des artéfacts de séquençage sur des prélèvements inclus en paraffine, ou constituer un évènement "de passage" (bystander). L'évènement le plus fréquemment retrouvé étant une mutation de PIK3CA dont les conséquences sur les cellules mesotheliales cancéreuses sont inconnues (De Rienzo *et al.*, 2016; Lo Iacono *et al.*, 2015; Mezzapelle *et al.*, 2013; Shukuya *et al.*, 2014).

➤ **HGFR ou c-Met:**

Le gène *c-Met*, localisé sur le chromosome 7 (locus 7q3) code pour un récepteur composé d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire à activité TK. L'HGF, sécrété par les cellules stromales, se lie à son récepteur c-Met conduisant à son autophosphorylation et par conséquent à l'activation d'un certain nombre de voies de signalisation, y compris de la voie de la PI3K, Ras-Rac/Rho, la protéine kinase Ras-MAPK, et les voies de la phospholipase C.

Le récepteur c-Met interagit aussi avec la protéine NF2 et avec d'autres récepteurs, avec comme intermédiaire de signalisation, la protéine kinase des adhésions focales FAK (Stamenkovic and Yu, 2010). Le récepteur c-Met intervient dans de nombreuses voies de signalisation : la croissance cellulaire, la différenciation, l'arrêt de l'apoptose, l'angiogenèse, la motilité cellulaire, l'invasion et les métastases (Jagadeeswaran *et al.*, 2006).

Des mutations du domaine juxta-membranaire du récepteur c-Met ont été décrites dans 3 à 16% des MPM, dont les conséquences fonctionnelles ne sont pas claires, et sa surexpression est retrouvée dans 74 à 100% des cas en IHC (Bois *et al.*, 2016; Jagadeeswaran *et al.*, 2006; Kawaguchi *et al.*, 2009; Levallet *et al.*, 2012).

Sa forme phosphorylée peut être transloquée dans le noyau où elle interagit avec le facteur de transcription PAX5 et semble donc exercer une activité de co-facteur transcriptionnel. Il est à noter qu'une localisation prédominante de c-Met à la membrane serait de meilleur pronostic qu'une localisation nucléaire ou cytoplasmique (Levallet *et al.*, 2012).

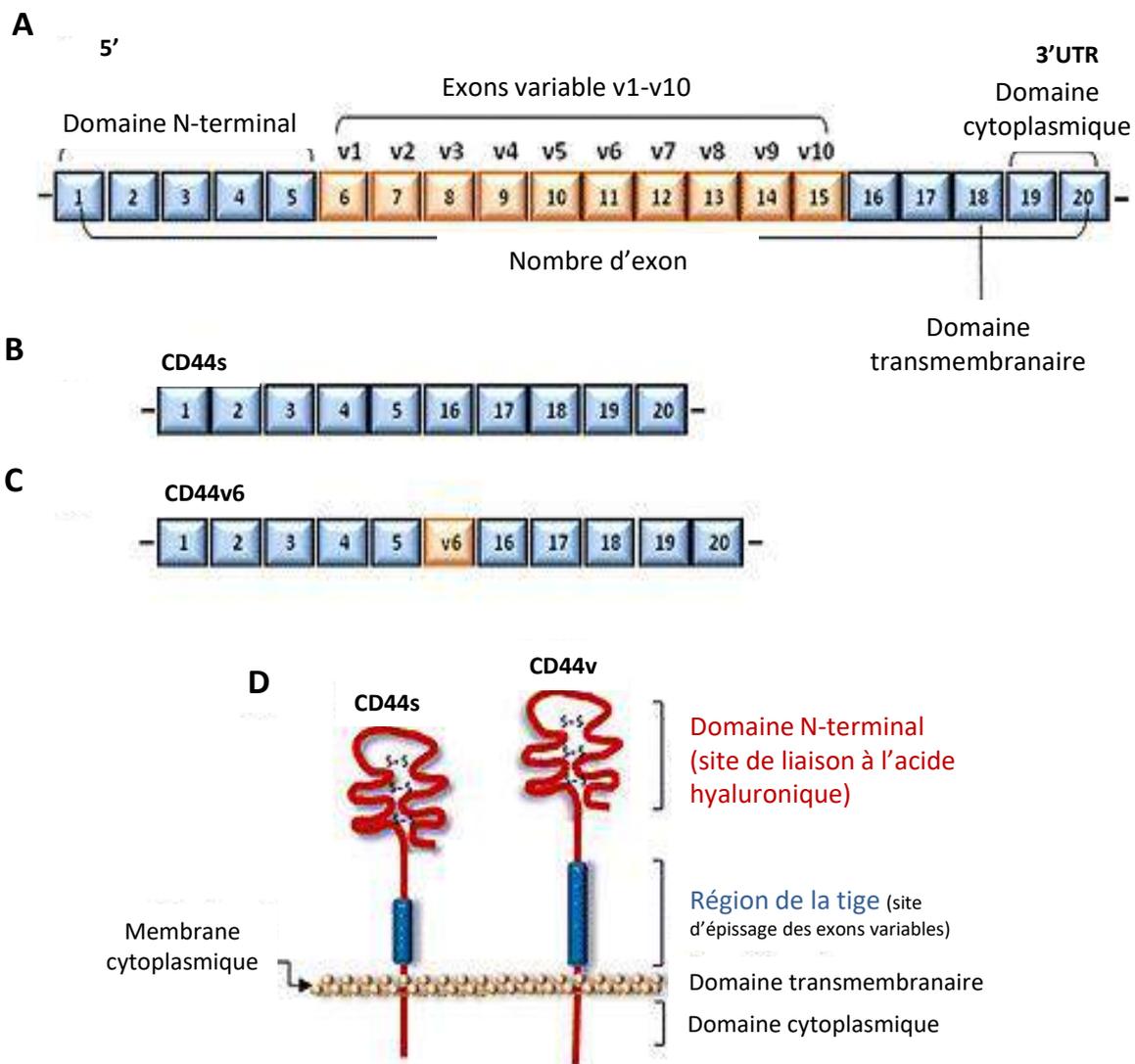


Figure 16 : Structure génomique et protéique du CD44.

A) Le gène *CD44* humain comprend 20 exons. L'épissage alternatif des exons variables, v1-v10 génère des isoformes variables. **B)** Le CD44 standard (CD44s) comprend les exons 1-5, 16-20, **C)** alors que la forme variante: CD44v6 contient les exons standard 1-5, 16-20 et l'exon variant 11 (v6). **D)** Le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire composée de quatre domaines fonctionnels: domaine N-terminal, région de la tige, domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique intracellulaire (d'après William *et al.*, 2013).

L'activation de c-Met pourrait contribuer à la pathogenèse de la maladie en favorisant la croissance cellulaire, la survie, la motilité et l'invasion. Bien que les cellules de MPM expriment elles-mêmes de HGF de façon autocrine, elles recrutent aussi des fibroblastes sécrétant de l'HGF, qui sont activés dans le microenvironnement tumoral, établissant ainsi un circuit paracrine renforçant la progression tumorale.

Le récepteur c-Met peut également être transactivé par un mécanisme indépendant des ligands qui implique une interférence complexe avec d'autres RTK, y compris l'EGFR, l'IGF-1R (Insulin-like growth factor-1 receptor), et le VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor) (Bonelli *et al.*, 2017a).

I.F.2.c. Le CD44 et l'acide hyaluronique favorisent la signalisation oncogénique des mésothéliomes

➤ **Le CD44, généralités**

Le CD44, une glycoprotéine transmembranaire, est le principal récepteur de l'Acide Hyaluronique (AH), un glycosaminoglycane présent en abondance dans la cavité pleurale. Le CD44 est une molécule d'adhésion de surface cellulaire impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule-matrice et exprimée dans de nombreux de type cellulaire (Goodison *et al.*, 1999). Cette protéine est codée par un gène situé sur le chromosome 11 (11p13) constitué de 20 exons générant 20 variants de poids moléculaires allant de 85 à 230 kDa (Figure 16).

Toutes les isoformes de CD44 possèdent une région constante, codée par les 5 premiers (1-5) et les 4 derniers exons (16-18 et 20). La présence seule de cette région code la forme la plus simple et la plus courte (85-95kDa), appelé CD44 standard (CD44s).

Une région variable peut être ajoutée au motif de base, constituée plus ou moins des exons 6 à 15 (CD44v) (Naor *et al.*, 1997). Les différentes isoformes de CD44 ayant une conformation différente, n'ont pas toutes les mêmes affinités pour l'AH : les variants possédant les exons 5 ou 6 sont les moins affins. Certaines isoformes de CD44 peuvent être décorées de motifs d'héparane sulfate, ces motifs leurs permettent de se fixer à l'EGF ou l'HGF (Bennett *et al.*, 1995), facteurs de croissance qui liés à leurs récepteurs respectifs favorisent l'expression du CD44 (Zhang *et al.*, 1998).

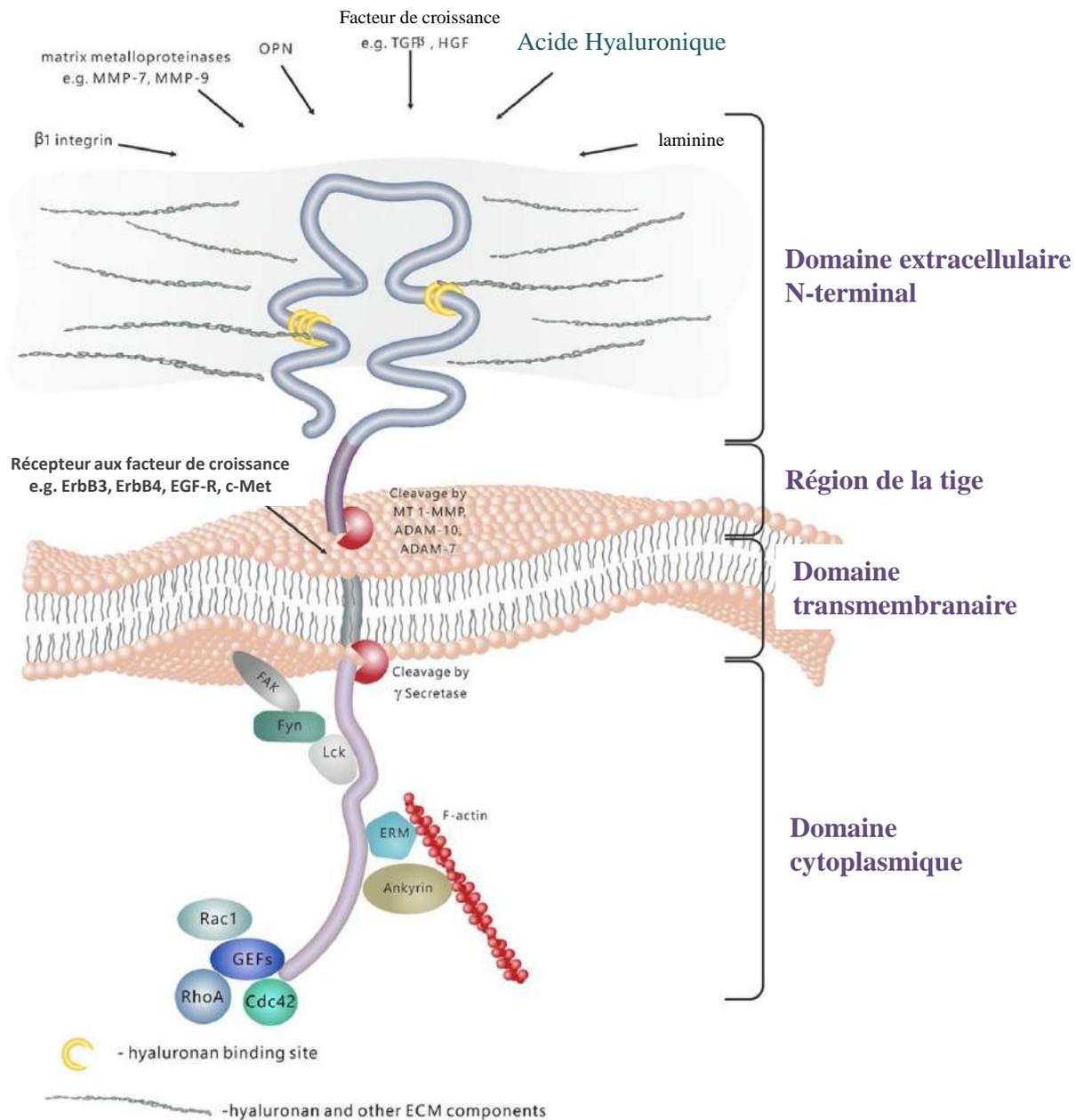


Figure 17 : Structure de la protéine CD44 et signalisation.

Le CD44 est une molécule transmembranaire composée de plusieurs domaines. Le domaine extracellulaire N-terminal peut lier divers ligands, y compris l'AH (acide hyaluronique), les glycoprotéines de la matrice extracellulaire (MEC), les protéoglycanes, les facteurs de croissance, les cytokines et les métalloprotéinases matricielles. Le clivage protéolytique dans la région de la tige conduit à la libération du domaine extracellulaire dans l'espace extracellulaire. Le domaine transmembranaire ancre et stabilise la molécule dans la membrane plasmique. Le domaine cytoplasmique est responsable de la transduction du signal par la liaison à différentes molécules, y compris les composants du cytosquelette, les kinases et les activateurs des petites GTPases Rho (facteurs d'échange GEFs-guanine nucléotide) (d'après Dzwonek et Wilczynski, 2015).

➤ Le CD44, structure

Le CD44 se constitue de plusieurs domaines fonctionnels (Figure 17) :

- le **domaine extracellulaire N-terminal** possède des motifs servant de sites d'ancrage à de nombreux ligands, dont l'AH, des glycoprotéines de la MEC et protéoglycanes, des facteurs de croissance, des cytokines et MMP (matrix metalloproteinases) (Ponta *et al.*, 2003; Yu et Stamenkovic, 1999). Ce domaine est séparé de la membrane plasmique par :
- la **région de la tige**, la partie variable de la protéine, porte des sites de clivages protéolytiques pour des métalloprotéinases (la désintégrine, les protéines ADAM-10 et ADAM-17 ou la métalloprotéinase de type 1 (MT1-MMP)). Le clivage du CD44 libère son domaine extracellulaire ce qui contribue à la régulation de la migration cellulaire (Okamoto *et al.*, 2002; Sugahara *et al.*, 2006).
- le **domaine transmembranaire** permet l'ancrage du CD44 à la membrane plasmique et sa stabilité.
- le **domaine cytoplasmique C-terminale** joue un rôle crucial dans l'implication de CD44 dans la transduction du signal intracellulaire. Il a été montré qu'il se lie aux éléments du cytosquelette tels que l'ankyrine, les protéines ERM ainsi que la protéine NF2 (Morrison *et al.*, 2001), il interagit également avec des membres de la famille Src kinases (SFK) : Src, Lck, Fyn et Lyn (Ponta *et al.*, 2003), et des activateurs de petites GTPases Rho (Bourguignon, 2012). Enfin, la queue cytoplasmique de CD44 peut être clivée par la γ -sécrétase et transloquée dans le noyau, où elle agit comme régulateur transcriptionnel (Nagano et Saya, 2004).

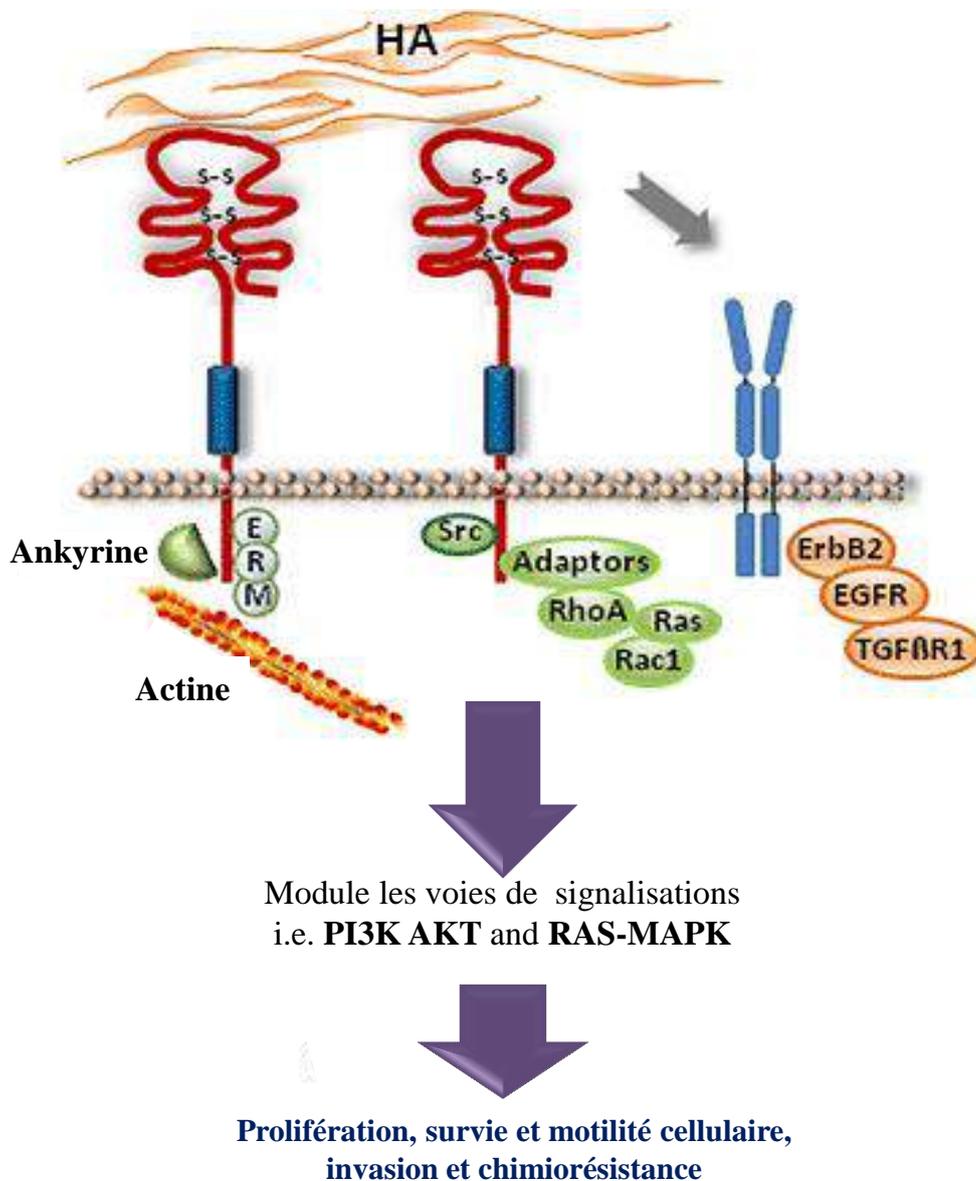


Figure 18 : Signalisation dépendante du CD44.

La liaison CD44/AH conduit à la transmission des signaux à travers le domaine cytoplasmique *via* la liaison avec diverses protéines cytosquelettiques telles que l'ankyrine, les protéines ezrin-redixin-moesin (ERM), les GTPases de la famille Rho, les kinases Src et les molécules associées. Toutes ces interactions modulent l'activité de différentes cascades de signalisation en aval, en particulier les voies MAP kinases et PI3/AKT, aboutissant à la prolifération des cellules tumorales, la survie cellulaire, la mobilité cellulaire, l'invasion tumorale et la chimiorésistance (d'après Cortes-Dericks et Schmid 2017).

➤ Fonctions et régulations du CD44

L'interaction de AH et du CD44 favorise la transduction du signal, régule l'assemblage de la matrice et la migration cellulaire, maintient la prolifération et la différenciation de cellules souches cancéreuses (Naor *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2013). Grâce à sa liaison au CD44, l'AH module également le cytosquelette et active les MMP impliquées dans la progression tumorale (Bourguignon *et al.*, 2014).

Le CD44 peut modifier les voies de signalisations intracellulaires telles que la voie des Rho (Bourguignon *et al.*, 2008), des MAP kinases ou encore PI3K/AKT (Toole, 2009) car même s'il ne possède pas d'activité kinasique propre il peut s'hétérodimériser avec des récepteurs à activités tyrosine kinase tels que l'EGF-R ou c-Met (Figure 18).

Le CD44 est impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire, la migration cellulaire, l'angiogenèse, la présentation des cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance aux récepteurs correspondants, et l'amarrage des protéases à la membrane cellulaire pour la survie cellulaire.

Toutes ces propriétés biologiques sont essentielles aux activités physiologiques des cellules normales, mais elles sont également associées aux activités pathologiques des cellules cancéreuses. En effet, le CD44 apparaît parfois promoteur de tumeur, parfois suppresseur de tumeur (Naor *et al.*, 1997).

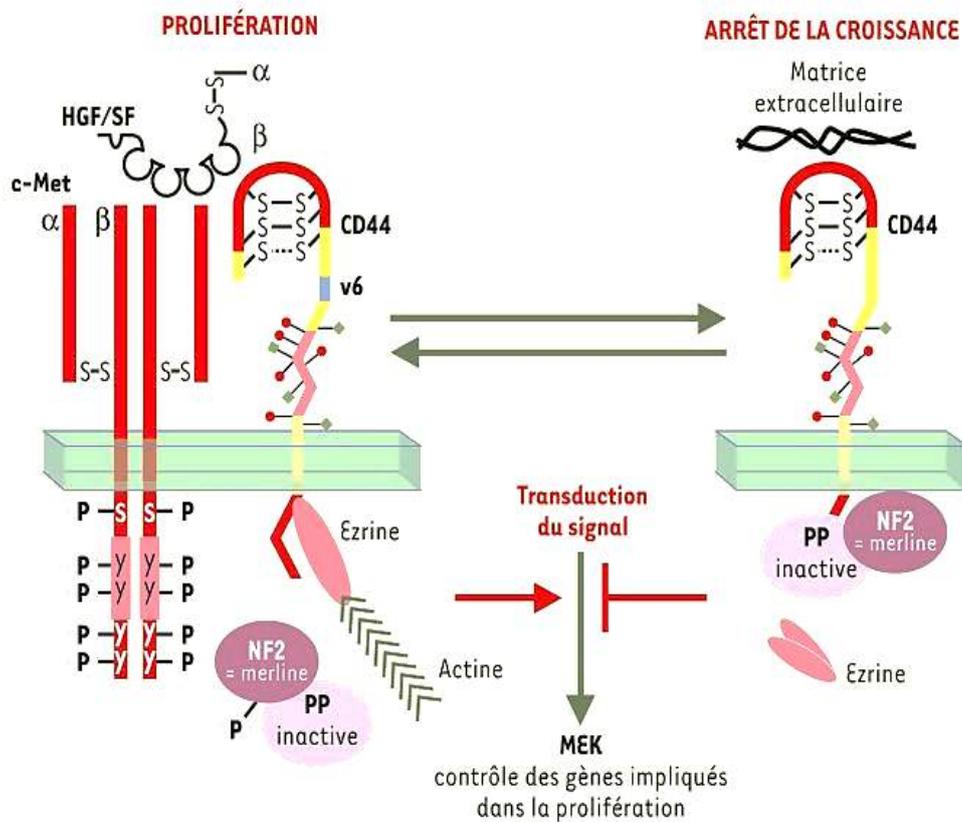


Figure 19 : Mécanismes d'action du CD44.

Lié à l'acide hyaluronique, le CD44 inhibe la croissance et l'invasion cellulaire, en recrutant et activant le suppresseur de tumeur – NF2 – qui se fixe à la place des protéines ERM et bloque la transduction du signal et par conséquent la prolifération des cellules. L'interaction c-MET/HGF et CD44 conduit à sa liaison avec le cytosquelette d'actine *via* les protéines ERM et à la transduction du signal.

HGF: hepatocyte growth factor; c-Met: récepteur à activité tyrosine kinase; ERM: ezrin-radixin-moesin; →: activation; —|: inhibition (Orian-Rousseau, 2003).

Le rôle suppresseur de tumeur du CD44 est lié à l'interaction de NF2 au CD44 (Morrison *et al.*, 2001), déphosphorylée, NF2 se lie au CD44 (50 premiers acides aminés de NF2) à la place des protéines ERM et bloque ainsi la transduction du signal et par conséquent la prolifération/invasion cellulaire (Figure 19). NF2 régule également négativement l'interaction CD44-HA et donc l'activité pro-tumorigène du CD44 (Bai *et al.*, 2007).

Enfin, NF2 prévient le clivage de l'ectodomaine du CD44, soutenant l'idée que le traitement protéolytique du CD44 favorise la croissance tumorale et l'hypothèse que les mutants NF2 naturellement prédisposés aux malignités n'inhibent pas le clivage de CD44 et favorise son rôle promoteur de tumeur (Hartmann *et al.*, 2015). La perte de NF2 favorise la tumorigenèse en déstabilisant les jonctions adhérentes médiées par la cadhérine (Lallemand, 2003).

Le rôle de promoteur de tumeur du CD44, dépend de la relation existant entre le CD44 et la kinase MST (Xu *et al.*, 2010), premier maillon de la cascade de kinases de la voie Hippo. En présence de taux élevé de CD44 standard, l'activité de YAP/TAZ ne peut être inhibée par leur phosphorylation par les kinases LATS qui sont en aval des kinases MST. En effet, le segment intracellulaire du CD44 fixe MST empêchant alors son action (Xu *et al.*, 2010).

Lorsque libéré suite au clivage du CD44, le segment intracellulaire peut être transloqué dans le noyau et moduler l'expression de certains gènes dont celui de MMP9 ce qui est également en faveur de l'augmentation de la capacité d'invasion des cellules exprimant davantage de CD44 standard (Miletti-González *et al.*, 2012).

Enfin, l'interaction CD44/AH semble également contribuer à la chimiorésistance. L'augmentation d'AH induit en effet une résistance des cellules tumorales initialement sensibles aux médicaments, notamment parce que l'AH en interagissant avec le CD44 stimule l'expression de MDR1 (Misra *et al.*, 2005) ou MRP2 (Ohashi *et al.*, 2007), transporteurs ABC, expulsant les substances cytotoxiques dont les traitements anti-cancéreux hors des cellules.

Tableau 4 : Bilan des études des 20 dernières années s'intéressant au diagnostic du CD44 dans le MPM.

Fonction	Méthode/échantillon	Référence
Un niveau élevé de CD44 indique la présence de cellules néoplasiques.	IHC / Tissus de MPM	Penno <i>et al.</i> 1995
Le niveau élevé de CD44 différencie le MPM de l'ADC.	IHC / mésothélium réactif, MPM, échantillons d'ADC	Attanoos <i>et al.</i> 1997
La localisation CD44 /AH discrimine un MPM d'un ADC.	IHC / fluides séreux inclus en paraffine	Afify <i>et al.</i> 2005
Le rapport CD44v6/CD44s facilite le diagnostic différentiel entre les tumeurs de MPM et non-MPM.	ELISA / liquides pleuraux	Porcel <i>et al.</i> 2011
Un faible niveau de CD44 aide au diagnostic différentiel de la différenciation néoplasique pleurale.	IHC / MPM épitheloïde et hyperplasie mésothéliale réactive des tissus	Ali <i>et al.</i> 2013
Une faible positivité de CD44 et une coloration élevée d'AH peuvent différencier un MPM d'un ADC.	IHC / Tissus de MPM	Törronen <i>et al.</i> 2016

MPM: Mésothéliome pleural malin, **IHC:** Immunohistochimie, **ADC:** Adénocarcinome, **AH:** Acide Hyaluronique, **ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay (d'après Cortes-Dericks et Schmid, 2017).

➤ CD44 et MPM

Plusieurs études ont révélé, il y a maintenant de nombreuses années l'existence de niveaux élevés d'AH dans des épanchements pleuraux de patients atteints de MPM (Frebourg *et al.*, 1987; Fujimoto *et al.*, 2013; Martensson *et al.*, 1994) puis rapportées l'interaction de l'AH et du CD44 dans le MPM (Cortes-Dericks et Schmid, 2017). En effet, certaines lignées de MPM possèdent des sites de liaison à AH sur leur surface cellulaire, alors que ces sites sont absents dans les cellules mésothéliales normales (Asplund et Heldin, 1994). Dans le MPM, il est plus particulièrement établi que l'AH et son récepteur facilitent la motilité cellulaire néoplasique et l'invasion, et donc que les interactions CD44/AH facilitent la progression tumorale. Des lignées cellulaires de MPM exprimant des quantités élevées de CD44 présentent ainsi une prolifération et une capacité d'invasion accrues après des traitements par AH. Ces aptitudes sont supprimées une fois le CD44 de ces cellules de MPM inactivé (Hanagiri *et al.*, 2012).

Une vue d'ensemble de la pertinence diagnostique du CD44 dans le MPM est présentée dans le Tableau 4 et regroupe les données de la littérature actuellement disponibles. Certains auteurs montrent que la localisation ainsi que le niveau d'expression du CD44 en plus de l'AH, par IHC, permet de discriminer un MPM d'un adénocarcinome (ADC) pulmonaire.

Tableau 5: La 8^{ème} classification TNM des tumeurs pleurales définie par l'International Mesothélioma Interest Groupe (IMIG) en janvier 2017.

TNM		Caractéristiques
Tumeur primaire (T)	Tx	Tumeur primitive ne pouvant pas être évaluée
	T0	Pas de tumeur primitive
	T1	Tumeur limitée à la plèvre pariétale homolatérale +/- viscérale +/- médiastinale +/- plèvre diaphragmatique
	T2	Tumeur impliquant chacune des surfaces pleurales homolatérales (plèvre pariétales, médiastinale, viscérale et diaphragmatique) avec au moins l'une des atteintes suivantes: <ul style="list-style-type: none"> • Implication du muscle diaphragmatique • extension de la tumeur de la plèvre viscérale dans le parenchyme pulmonaire sous-jacent
	T3	Tumeur localement avancée mais potentiellement résécable, impliquant toutes les surfaces pleurales homolatérales (plèvre pariétale, médiastinale, viscérale et diaphragmatique) avec au moins l'une des atteintes suivantes: <ul style="list-style-type: none"> • Implication du fascia endothoracique • extension dans la graisse médiastinale • solitaire, foyer complètement résécable de la tumeur s'étendant dans les tissus mous de la paroi thoracique • Implication non-transmurale du péricarde
	T4	Tumeur localement avancée, non résécable, impliquant toutes les surfaces pleurales homolatérales, avec au moins l'une des atteintes suivantes: <ul style="list-style-type: none"> • extension diffuse ou multifocales de la tumeur dans la paroi thoracique, avec ou sans destruction costale associée. • extension directe trans-diaphragmatique de la tumeur au péritoine • extension directe de la tumeur à la plèvre controlatérale et/ou aux organes médiastinaux et/ou à la colonne vertébrale (rachis) • tumeur s'étendant à la surface interne du péricarde avec ou sans épanchement péricardique; ou une tumeur impliquant le myocarde
Nœuds lymphatiques régionaux (N)	Nx	Les ganglions lymphatiques régionaux ne peuvent pas être évalués
	N0	Pas de métastases ganglionnaires régionales
	N1	Métastases dans les ganglions lymphatiques bronchopulmonaires homotéraux, hilaires ou médiastinaux (y compris les ganglions lymphatiques mammaires internes, péri-diaphragmatiques, adipeux péricardique ou ganglions lymphatiques intercostaux).
	N3	Métastases dans les ganglions lymphatiques controlatéraux supra-claviculaires ou médiastinaux homolatéraux controlatéraux.
Métastases (M)	M0	Pas de métastase à distance
	M1	Métastase à distance présente

I.G. Prise en charge diagnostique et thérapeutique du mésothéliome pleural malin

Le diagnostic du MPM est souvent posé à un stade tardif de la maladie du fait de signes cliniques aspécifiques, les plus fréquents étant la dyspnée et/ou la douleur thoracique, la toux irritative, l'altération de l'état général du patient souvent accompagnée d'un épanchement pleural et d'un épaissement de la plèvre au scanner. Parfois, les patients sont asymptomatiques et leur maladie est découverte fortuitement sur un examen radiologique dans un contexte d'exposition professionnelle à l'amiante et de surveillance post-professionnelle.

Le diagnostic est établi par un **examen anatomo-pathologique** (classification OMS 2015) avec **une étude immunohistochimique** (2 marqueurs positifs et 2 négatifs recommandés) au mieux après une thoracoscopie (visualisation complète de la cavité pleurale avec des biopsies multiples et de bonnes tailles), qui est l'examen de choix pour le diagnostic du mésothéliome. En plus de la difficulté du diagnostic histologique, contrairement au cancer bronchique, la classification TNM (Tumor Node Metastasis) de l'IMIG (International Mesothelioma Interest Group) (Tableau 5) est difficile à utiliser en pratique clinique pour prédire la survie de manière fiable. Ce système de stadification est en effet basée sur l'exploration chirurgicale de la cavité pleurale, alors que la grande majorité des patients ne sont pas opérés et par conséquent ne peuvent être classés (Enewold *et al.*, 2017).

En janvier 2017, une 8ème classification TNM a été proposée par l'IMIG, plus facile à utiliser mais reposant toujours sur l'exploration chirurgicale, et donc difficile à appliquer sur la seule base d'un scanner ou TEP (tomographie par émission de positons) (Brosseau *et al.*, 2017; Nowak *et al.*, 2016; Rice *et al.*, 2016; Rusch *et al.*, 2016). Des travaux rétrospectifs dans les grands groupes d'oncologie (EORTC ou CALB) ont rapporté une valeur pronostique importante, des facteurs cliniques et biologiques plus simples permettant une stratification des patients plus facile qu'avec la TNM selon l'anémie, la thrombocytose, la leucocytose, l'histologie non épithélioïde tous associés à une survie sans progression (SP) plus courte (Edwards *et al.*, 2000).

Malgré les progrès récents qui laissent présager des espoirs en termes de prise en charge thérapeutique, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif validé du mésothéliome. Différents traitements pourront être proposés après une réunion de concertation pluridisciplinaire organisée dans l'un des centres experts cliniques des MPM (réseau MESOCLIN) pour une

décision de prise en charge qui est hautement spécialisée (selon l'état général du patient, la résecabilité de la tumeur ou encore le type histologique). Le traitement est ensuite mis en place par l'équipe de cancérologie de proximité.

- la **chimiothérapie** par combinaison du pemetrexed et cisplatine était encore récemment le traitement de référence de première ligne et a permis depuis 2003 de changer l'histoire naturelle de la maladie en améliorant la survie globale médiane des patients de 9,3 à 12,1 mois (Vogelzang *et al.*, 2003). Le principe de cette association est de conjuguer l'action d'un agent intercalant (cisplatine) qui inhibe la réplication et la transcription de l'ADN en ARN provoquant la mort cellulaire par apoptose, à celle d'un inhibiteur de la thymidylate-synthase (TS) et de plusieurs autres enzymes du métabolisme de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques (le pemetrexed est un analogue de l'acide folique), inhibant donc la synthèse de l'ADN. Tout récemment, l'association du bevacizumab (anticorps monoclonal anti-VEGF) au schéma cisplatine-pemetrexed est devenu en France le traitement de référence standard du MPM (Brosseau *et al.*, 2017) grâce aux résultats positifs de l'essai clinique MAPS (Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study). Les recommandations du National Comprehensive Cancer Network ont également inclus cette combinaison comme une option pour la thérapeutique de première ligne.
- la **chirurgie** n'est pas validée en clinique courante et dépend de plusieurs facteurs (du chirurgien, du centre, le bon état général du patient avec un stade précoce et résecable). Elle doit être pratiquée au sein de centres spécialisés pouvant assurer une prise en charge multidisciplinaire et n'est pas recommandée en dehors d'essais cliniques. La chirurgie joue un rôle important dans le diagnostic et la stadification du MPM mais son rôle thérapeutique reste controversé, bien qu'elle puisse parfois être proposée avec une intention curative ou associée à une chimiothérapie néoadjuvante et/ou la radiothérapie dans le cadre d'un traitement multimodal (Scherpereel, 2017). Deux types de chirurgie sont proposées chez des patients hyper-sélectionnés et rares : la pleuro-pneumectomie élargie (PPE) actuellement abandonnée par tous, et la pleurectomie/décortication (P/D), pouvant être étendue au diaphragme et au péricarde si ceux-ci sont envahis (eP/D).

- la **radiothérapie** est limitée par le voisinage direct d'organes à risques et donc très restreinte en routine, elle est principalement utilisée à visée palliative antalgique. L'irradiation peut être proposée en prophylaxie afin de réduire le risque de dissémination du MPM à la paroi thoracique le long du trajet des gestes invasifs (points de ponction, orifices de drainage ou de thoracoscopie). La radiothérapie post-opératoire après PPE n'est proposée que dans le cadre d'essais cliniques, intégrée à un traitement multimodal (association de la chirurgie, chimiothérapie et de la radiothérapie).
- le **traitement multimodal**, incluant une irradiation de l'hémithorax qui a été proposée dans le cadre d'une stratégie associant la pleuro-pneumectomie, la chimiothérapie néoadjuvante/adjuvante et la radiothérapie radicale de l'hémithorax. Plusieurs essais cliniques n'ont malheureusement pas démontré la faisabilité en routine de cette approche et de son impact sur la survie globale, même en sélectionnant des patients avec une faible masse tumorale.
- les **thérapies ciblées**, dans le cadre d'essais cliniques n'ont pas montré d'efficacité en ciblant l'EGFR, c-Met ou IFG1-R. Seul le large essai MAPS a permis de mettre en évidence le bénéfice de l'association du bétacizumab (BVZ), ciblant le VEGF, à un doublet standard de chimiothérapie ([cet essai sera décrit dans la partie II, section Introduction](#)).
- l'**immunothérapie** anti-tumorale est aussi étudiée en ciblant les points de contrôle immunitaire notamment par des inhibiteurs anti-PD-1 (programmed cell death protein 1) ou anti-PD-L1 (PD-Ligand 1), les résultats de phase 2, chez des patients traités en 2ème et 3ème ligne après chimiothérapie classique sont plutôt prometteurs. D'autres anticorps ciblant la mésothéline sont aussi testés, avec des résultats plus limités et décevants à ce jour.

Actuellement, l'évolution de la maladie est fatale dans la quasi-totalité des cas, quelque soit le traitement mis en œuvre c'est pourquoi les essais cliniques sont indispensables dans la recherche de nouveaux traitements du MPM.

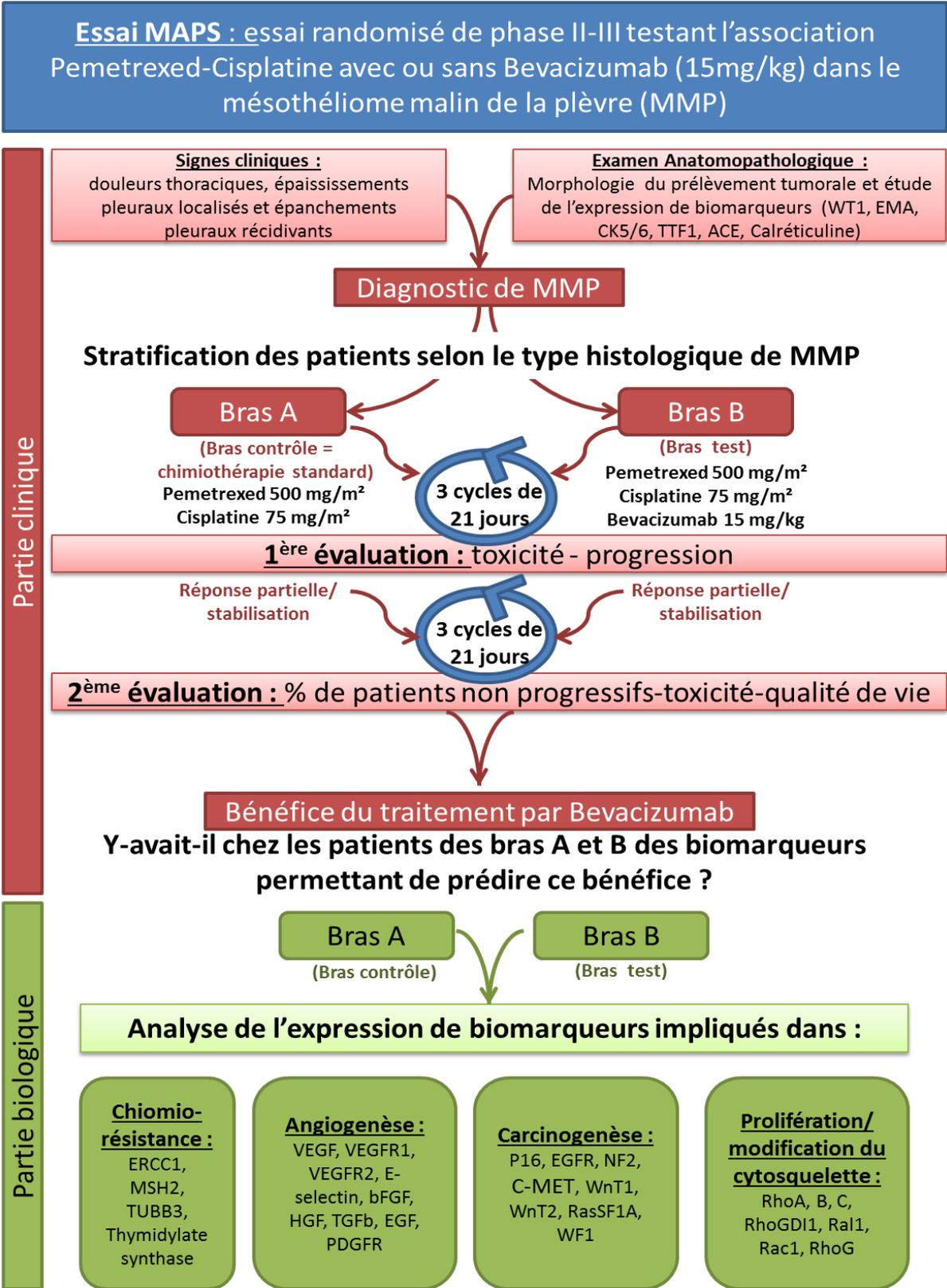


Figure 20 : Représentation schématique de l'essai randomisé IFCT-07101 MAPS.

II. L'essai clinique de phase III Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS)

Au vu du mauvais pronostic, de la prise en charge tardive des patients et de la faible efficacité des traitements alors disponibles en 2007, l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT) a initié un essai clinique randomisé de phase III : l'essai MAPS (IFCT-GFPC-0701). Cet essai constitue le premier essai clinique positif sur la survie globale concernant le MPM depuis 12 ans et offre l'opportunité de remplir un second objectif, l'étude Bio-MAPS. En effet, l'essai clinique MAPS a été l'occasion de constituer une collection unique en France de prélèvements de MPM, centralisés sur a plateforme d'Histologie du CHU de Caen. L'expression de nombreuses cibles alors connues pour être associées à l'angiogenèse (VEGF, VEGFR1/2/3, c-Met...) et/ou la chimiorésistance (ERCC1, TS, MSH2, TUBB3...) a été mesurée dans ces prélèvements tumoraux de même qu'ont été déterminées les altérations de la voie de signalisation RASSF/Hippo, une voie aujourd'hui décrite pour son implication dans la carcinogénèse pleurale. Ces données biologiques ont été confrontées aux données de survie (globale et sans progression) des patients inclus dans MAPS.

II.A. Le Protocole MAPS

L'essai MAPS est un essai clinique randomisé de phase III mené auprès de 448 patients atteints de MPM jugés non résecables testant l'association du doublet standard cisplatine/pemetrexed avec l'anti-angiogénique bevacizumab au même doublet de chimiothérapie seule. Les patients ont été randomisés par minimisation 1.1 entre les deux bras de traitement avec une stratification sur l'histologie (épithélioïde vs. non épithélioïdes), le PS (PS 0-1 vs PS2) et sur le centre (Figure 20). Le traitement était constitué par l'administration initiale de 3 cycles de 21 jours :

- **Bras A** (contrôle) : les patients recevaient au J1 d'un cycle de 21 jours, du pemetrexed $500\text{mg}/\text{m}^2$ sur 10 minutes suivi 30 minutes plus tard du cisplatine $75\text{mg}/\text{m}^2$ sur 2 heures.
- **Bras B** (Expérimental) : les patients recevaient en plus du doublet standard du bevacizumab $15\text{mg}/\text{kg}$ administré par voie intraveineuse tous les 21 jours.

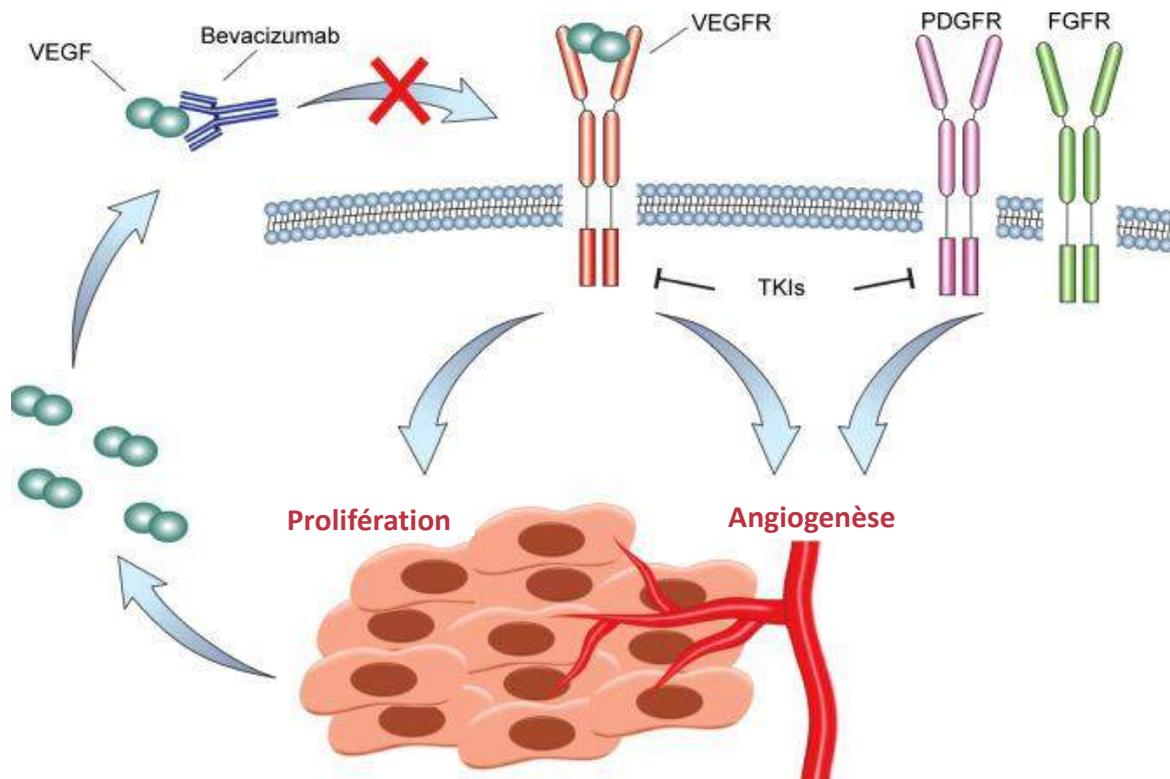


Figure 21: Les mécanismes d'inhibition de la signalisation VEGF dans le MPM.

Le VEGF est exprimé par les cellules de MPM et lie son récepteur (VEGFR). L'activité du VEGFR augmente la prolifération des cellules de MPM et contrôle l'angiogenèse conjointement avec d'autres récepteurs, tels que le PDGFR et le FGFR (fibrocyte growth factor). Le Bevacizumab en se liant au VEGF, prévient l'activation de son récepteur. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (TKI), bloquent l'activité du VEGFR ainsi que l'activité d'autres récepteurs tels que PDGFR et FGFR (d'après Levin et Dowell, 2017).

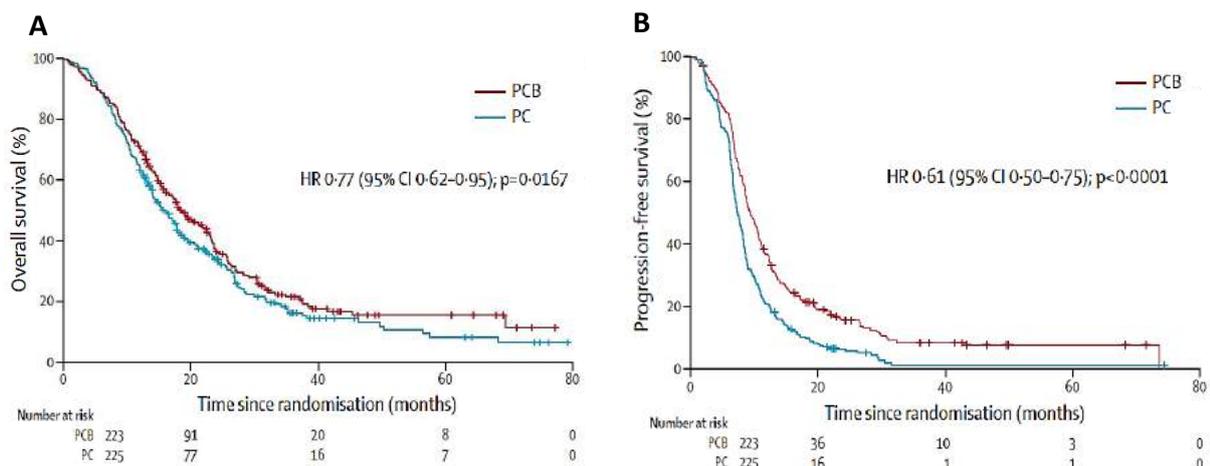


Figure 22: Survie globale et survie sans progression des patients atteints de mésothéliome pleural malin et inclus dans l'essai clinique MAPS.

Courbe de Kaplan-Meier représentant **A**) la survie globale et **B**) la survie sans progression. Les croix désignent les patients censurés. HR = Hazard ratio. PC = pemetrexed + cisplatine. PCB = pemetrexed + cisplatine + bevacizumab, (Zalcman *et al.*, 2016).

Une réévaluation est réalisée après trois cycles de chimiothérapie, et trois cycles supplémentaires étaient administrés en cas de bonne tolérance et de contrôle tumoral (réponse et stabilité sous traitement). Au bout des six cycles, si le patient présentait une réponse partielle ou une stabilisation, un traitement de maintenance par bevacizumab pouvait être envisagé à la même dose, toutes les 3 semaines jusqu'à progression ou toxicité, dans le bras expérimental. Il n'y avait par contre qu'une surveillance radio-clinique simple dans le bras standard, chez les patients en contrôle tumoral à 6 cures.

II.A.1. Le Bevacizumab®, agent anti-angiogénique: nouveau traitement du MPM en association au doublet standard

Le MPM est une tumeur très angiogénique. En effet, le taux de VEGF circulant est souvent très élevé chez les patients atteints d'un MPM et ce taux constitue un facteur pronostique défavorable. Le VEGF, un puissant mitogène des cellules endothéliales, favorise aussi les cellules de MPM en stimulant directement de façon autocrine la prolifération des cellules tumorales qui expriment simultanément les récepteurs au VEGF, en plus de son action sur la néo-angiogenèse (Strizzi *et al.*, 2001). Plusieurs thérapies anti-angiogenèse ont vu le jour depuis plus de 15 ans ciblant le VEGF plutôt que le VEGFR, dont le Bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF, prévenant la liaison du VEGF à son récepteur à la surface des cellules endothéliales, et neutralisant ainsi son activité biologique (Figure 21). Le Bevacizumab limite la prolifération des cellules endothéliales, normalise les vaisseaux sanguins existants et empêche la formation de nouveaux vaisseaux et a une action directe sur la division des cellules mésothéliales (Aoe *et al.*, 2006; Levin et Dowell, 2017; Strizzi *et al.*, 2001).

II.A.2. L'ajout du Bevacizumab au doublet standard est associé à un meilleur pronostic

L'essai MAPS a démontré le bénéfice de l'association du Bevacizumab au doublet Pemetrexed-Cisplatine chez 448 patients atteints de MPM, en améliorant leur survie globale (médiane à 18,8 mois versus 16,1 mois pour le groupe avec le doublet seul, HR=0,76; p=0,0127) et la survie sans progression (médiane à 9,6 mois versus 7,5 mois, HR=0,61; p<0,0001) (Figure 22).

Enfin le triplet n'a pas d'impact délétère sur la qualité de vie (une toxicité acceptable) évaluée par des scores de qualité de vie validés, ce qui en fait un nouveau paradigme de traitement pour ce cancer (Zalcman *et al.*, 2016).

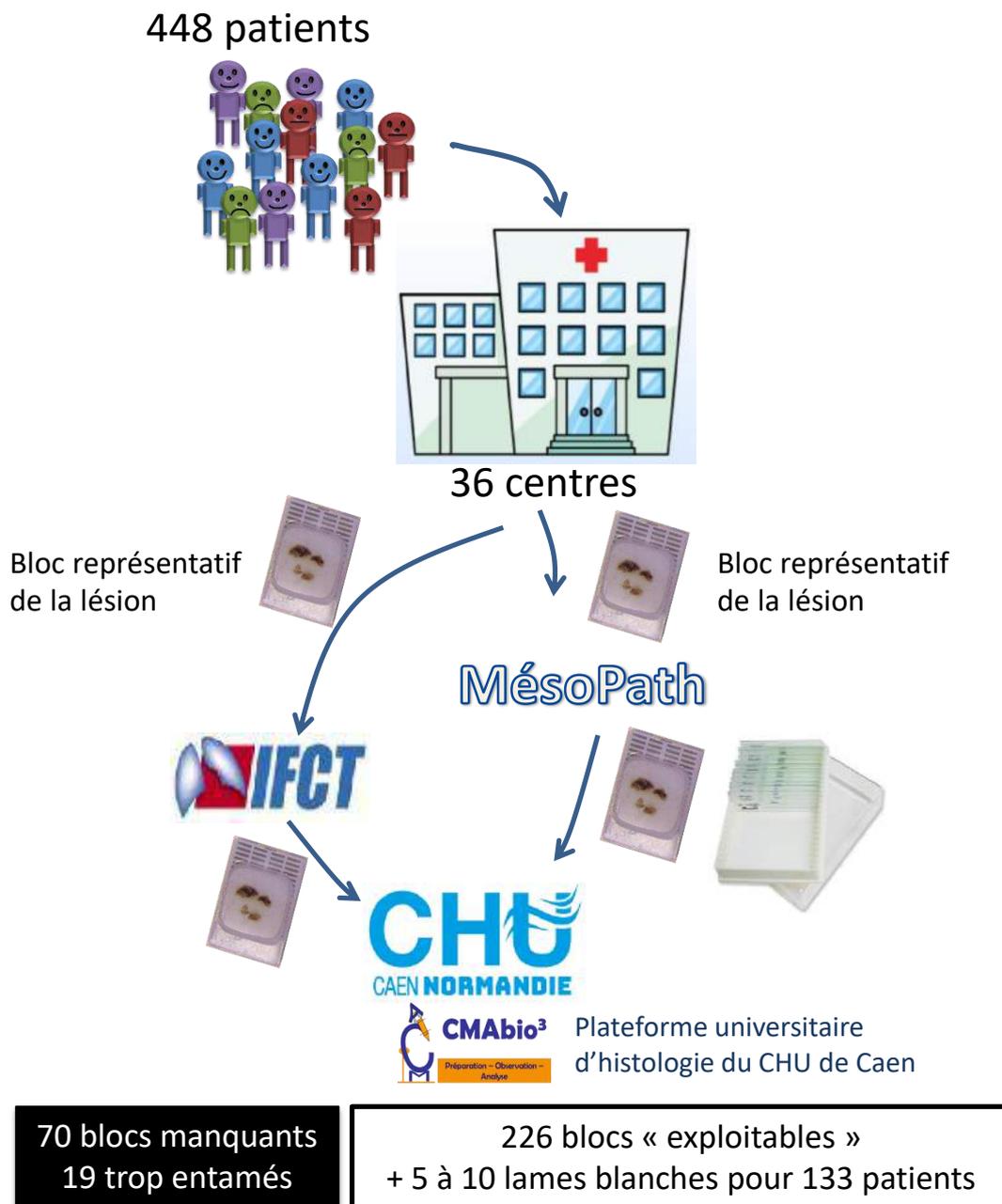


Figure 23 : Centralisation et exploitation des prélèvements tumoraux de l'étude Bio-MAPS.

L'essai clinique MAPS a enrôlé 448 patients atteints de mésothéliome pleural malin grâce à la participation de 36 centres. Ces centres ont adressé les prélèvements tumoraux (1 bloc de paraffine contenant un prélèvement représentatif de la lésion) soit à l'IFCT, soit au groupe MESOPATH. L'IFCT et MESOPATH ont ensuite fait parvenir ces blocs ou quelques lames blanches de ces blocs à la plateforme d'Histologie du CHU de Caen. A la réception, 70 blocs manquaient, 19 prélèvements tumoraux étaient trop entamés (% cellules tumorales <1%), si bien que nous avons reçu les blocs de 226 patients et pour 133 patients nous avons également 5 à 10 lames blanches.

II.B. Le Protocole Bio-MAPS

Adossée à l'essai MAPS, l'étude Bio-MAPS (le volet biologique) avait pour objectif d'établir un profil biologique des patients inclus dans cet essai clinique, en quantifiant l'expression de plusieurs marqueurs tumoraux et/ou d'angiogenèse à partir des coupes histologiques de biopsies tumorales, du sérum et du liquide pleural des patients. Concernant les biopsies (Figure 23) : les prélèvements tumoraux des 448 patients enrôlés dans l'essai MAPS inclus en paraffine par les 36 centres ayant participé à cet essai, ont été collectés par l'IFCT et/ou MESOPATH, puis centralisés sur la plateforme universitaire d'Histologie du CHU de Caen. A la réception, 70 blocs étaient manquants, 19 étaient non exploitables (le pourcentage de cellules tumorales était <1%), et pour 133 patients, seuls des lames blanches nous ont été transmises. Concernant les biomarqueurs caractérisés dans ces prélèvements : les recherches du statut de méthylation des gènes suppresseurs de tumeurs (RASSF1A, RASSF2A, RASSF5, RASSF6, RASSF10, MST1, MST2, LATS1, LATS2) ont ainsi pu être déterminées chez 226 patients et les quantifications d'expression protéique par IHC : CD44, Amphiréguline, TS, CD34, MSH2, VEGFR2, YAP, TAZ, β -tubuline 3, c-Met) chez 359 patients.

Bio-MAPS représente ainsi la plus grande cohorte de patients atteints de MPM de prises en charge homogènes caractérisée en Europe.

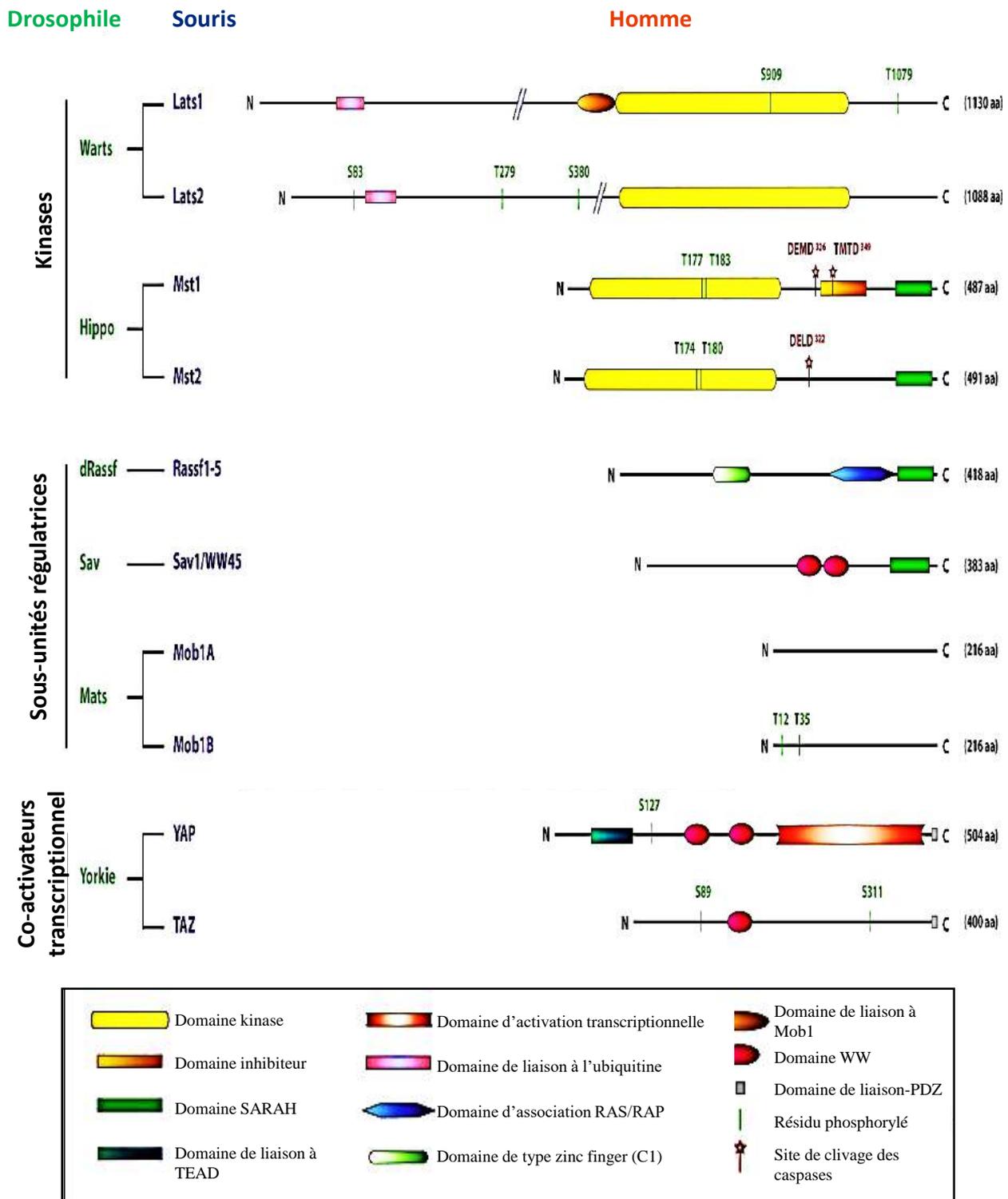


Figure 24: Evolution des membres de la voie Hippo entre la drosophile, la souris et l'Homme (d'après Avruch *et al.*, 2012).

III. La voie de signalisation Hippo

III.A. Description générale

Initialement identifiée et caractérisée chez la drosophile, la voie de signalisation Hippo tire son nom de l'un de ses principaux membres, la kinase Hippo (MST chez le mammifère), les mutations de ce gène conduisant à une hyperplasie tissulaire générant un phénotype qui a évoqué l'aspect d'un hippopotame (hippopotame-like). Hautement conservée de la drosophile aux mammifères, la voie de signalisation Hippo régule la taille des organes car contrôle les processus de prolifération cellulaire et d'apoptose (Meng *et al.*, 2016; Yu et Guan, 2013). Cette voie joue également un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement des cellules souches et des tissus (Zhao *et al.*, 2011).

La voie Hippo s'est complexifiée au cours de l'évolution, les homologues des gènes de drosophile existent souvent avec plusieurs isoformes, codées par des gènes différents, chez le mammifère (Figure 24).

Ces isoformes (MST1/2, LATS1/2...) très proches sur un plan structurel ont souvent des rôles superposables, mais de plus en plus de rôles propres à chaque isoforme émergent dans la littérature comme nous le détaillerons ci-dessous. Pour une question de clarté, sauf exception, seule la voie de signalisation Hippo des mammifères sera décrite dans ce manuscrit.

Chez les mammifères, la voie Hippo est subdivisée en trois groupes de protéines (Figure 25) :

- **les régulateurs** qui agissent **en amont**: il s'agit pour la plupart de molécules nécessaires à l'adhésion et/ou la polarité apico-basale des cellules épithéliales, souvent localisées au niveau des jonctions cellulaires comme NF2. Ce groupe comprend aussi la protéine RASSF1A;
- **les kinases et leurs adaptateurs respectifs** constituant le **cœur** même de la voie Hippo, s'activant les unes les autres par une cascade de phosphorylations successives. Les premiers couples activés sont les kinases de la famille **MST1/2** et leur adaptateur, WW45. Le complexe WW45/MST1/2 interagit alors avec les kinases **NDR (LATS1/2 et NDR1/2** (Nuclear Dbf2-related 1/2)) qui phosphorylées/activées par MST1/2 se lient alors à leur propre adaptateur, Mob1A/B (Mps one binder) *via* leur domaine NTR (N-Terminal Regulatory domains), et phosphorylent à leur tour :

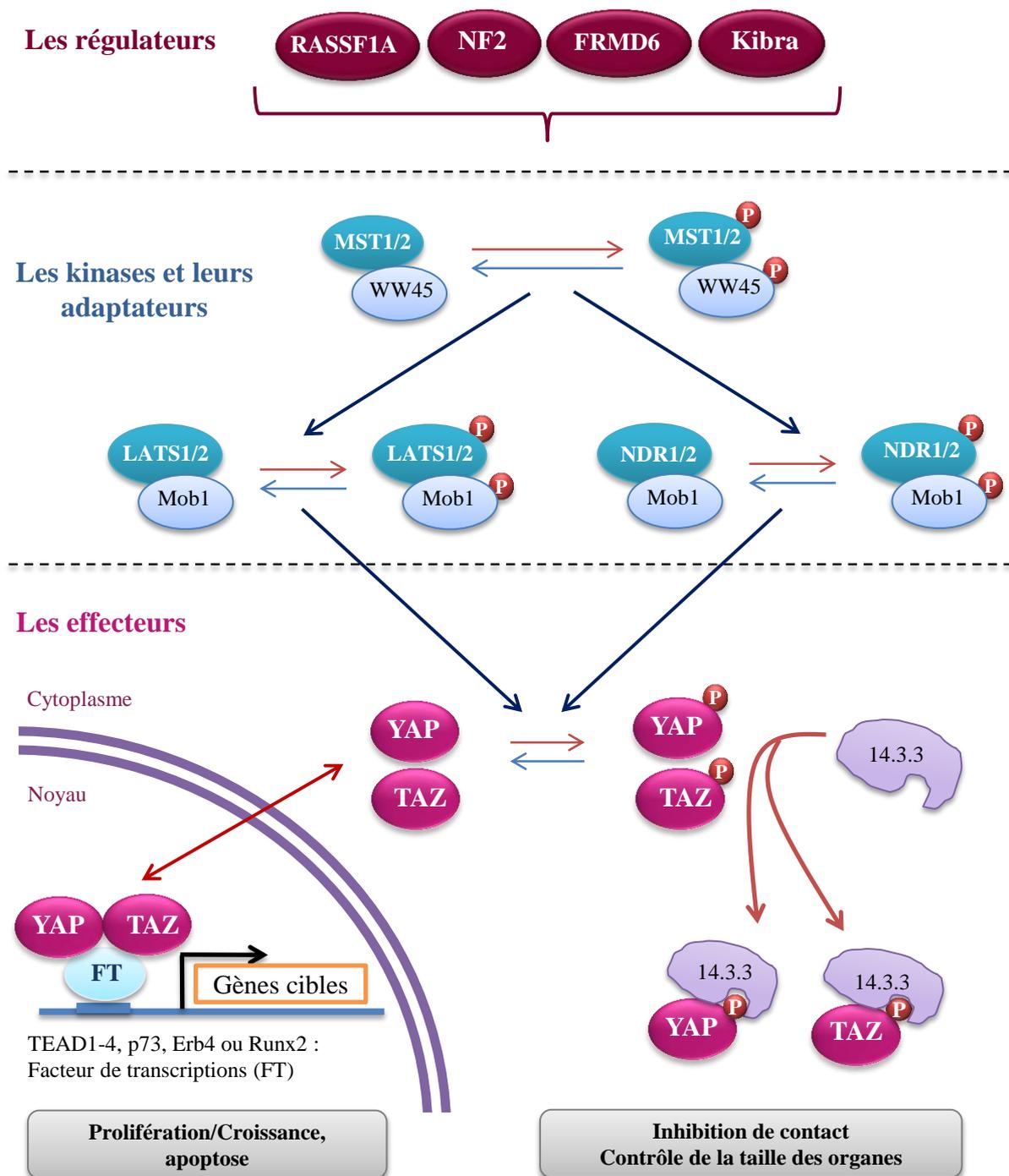


Figure 25 : La voie de signalisation Hippo.

Cette voie comprend i) des régulateurs agissant en amont de la voie, ii) des kinases : MST1/2 et NDR (LASTS1/2 et NDR1/2) et leurs adaptateurs respectifs WW45 et Mob1A/B constituant le cœur de la voie et iii) des effecteurs terminaux en aval de la voie : YAP et TAZ. Phosphorylés (inactivés) par les kinases NDR, les effecteurs sont séquestrés dans le cytoplasme par des protéines telles que 14.3.3. permettant ainsi de contrôler la taille des organes. Non phosphorylés (activés), YAP/TAZ sont transloqués dans le noyau permettant la transcription des gènes impliqués dans la croissance et l'inhibition de l'apoptose cellulaire.

- **les effecteurs terminaux, en aval** de la voie : les cofacteurs transcriptionnels YAP et TAZ, qui phosphorylés par les kinases LATS1/2 respectivement sur la Ser¹²⁷ et la Ser⁸⁹, sont séquestrés dans le cytoplasme par la protéine 14.3.3 (Zhao *et al.*, 2007) ou l'alpha-caténine (Schlegelmilch *et al.*, 2011; Silvis *et al.*, 2011). Lorsque les kinases LATS1/2 sont inactives, YAP et TAZ non phosphorylés sur ces sérines sont libres et transloqués dans le noyau, où ils peuvent interagir avec de nombreux facteurs de transcription pour aller contrôler l'expression de plusieurs gènes cibles (Figure 25). Une phosphorylation activatrice de YAP peut être apportée sur la tyrosine 357 par la kinase SRC/YES1, c-Abl ou encore FAK et favorise la localisation nucléaire de YAP (Kim et Gumbiner, 2015; Levy *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2016b; Rosenbluh *et al.*, 2012; Taniguchi *et al.*, 2015). Les cofacteurs YAP et TAZ, sont alors capables de réguler, l'apoptose, la motilité la croissance et prolifération cellulaire. Comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit, d'autres voies de signalisation que la voie Hippo, peuvent moduler l'activité transcriptionnelle de ces effecteurs terminaux, ces régulations de YAP et TAZ sont dites « non canoniques » (Yu et Guan, 2013).

La voie Hippo est essentielle à l'établissement des épithéliums, au cours de leur formation les cellules épithéliales indifférenciées prolifèrent jusqu'à ce qu'elles atteignent la confluence, l'inhibition de contact entraînant un arrêt de la prolifération et la différenciation/polarisation de ces dernières. La voie Hippo participe à la transition entre cet état prolifératif/indifférencié et cet état non prolifératif/différencié des cellules épithéliales :

Dans les cellules indifférenciées et en prolifération (non confluentes), les kinases du cœur de la voie Hippo sont **inactives**, les effecteurs terminaux YAP/TAZ non phosphorylés entrent dans le noyau, activent les gènes impliqués dans la prolifération et la croissance cellulaire et inhibent les voies apoptotiques. A confluence, les régulateurs de la voie Hippo sont activés et activent à leur tour, les kinases de cette voie dont les kinases NDR qui phosphorylent YAP/TAZ conduisant à leurs séquestrations dans le cytoplasme par des protéines telles que la protéine 14.3.3 et leurs orientations vers le protéasome : la prolifération cellulaire est stoppée.

A l'exception de YAP et TAZ, tous les membres la voie Hippo sont des gènes suppresseurs de tumeur fréquemment altérés dans les cancers conduisant à la dérégulation de cette voie et l'activation inappropriée de YAP/TAZ (Janse van Rensburg et Yang, 2016). Malgré l'inhibition de contact, YAP/TAZ continuent de transcrire des gènes en faveur de la division cellulaire, de la dédifférenciation des cellules et inhibant l'apoptose (Huo *et al.*, 2013; Janse van Rensburg et Yang, 2016; Yu *et al.*, 2017; Zygulska *et al.*, 2017).

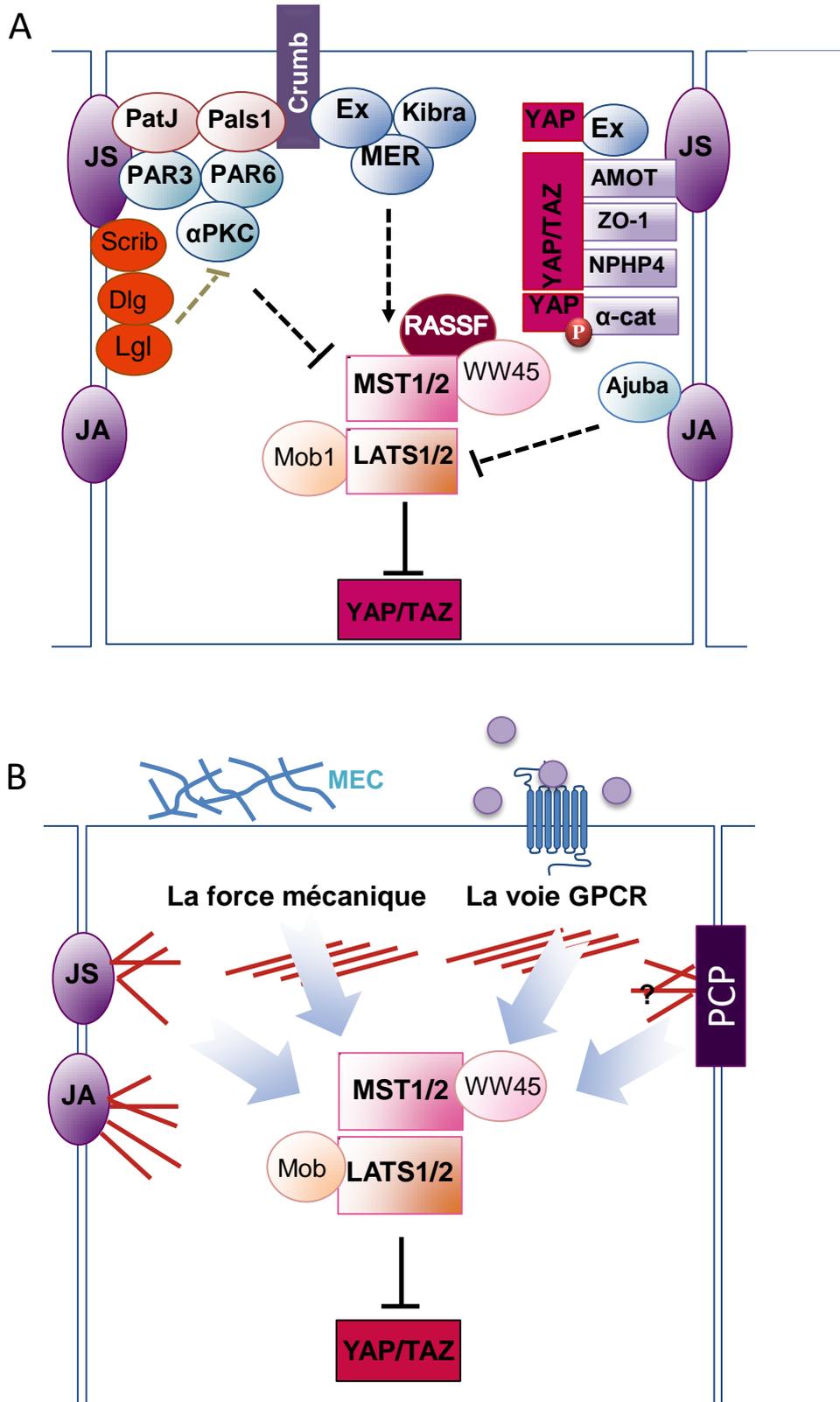


Figure 26: Régulation de la voie de signalisation Hippo par les complexes jonctionnels (A) et l'environnement cellulaire (B) .

JA: jonction adhérente, **JS:** jonction serrée, **PCP:** Polarité planaire cellulaire, **MEC :** Matrice extracellulaire (d'après Yu *et al.*, 2013).

III.B. Présentation détaillée des différents membres de la voie de signalisation Hippo

III.B.1. Les régulateurs :

La plupart des protéines, pouvant réguler les kinases (MST1/2 et LATS1/2) et les cofacteurs YAP/TAZ, sont localisées au niveau des jonctions intercellulaires (serrées et adhérentes). Ces régulateurs sont impliqués dans le maintien de la polarité apico-basale et/ou impliqués dans le maintien du phénotype des cellules épithéliales (Shiban 2013) (Figure 26A).

Toutefois d'autres régulateurs existent : des signaux physiques, le stress, les contacts cellulaires, les signaux mécaniques et chimiques (facteurs solubles activant les récepteurs couplés aux protéines G) (Michgehl *et al.*, 2017) (Figure 26B), il s'agit de régulateurs traduisant les contraintes exercées sur la cellule épithéliale (tension du cytosquelette, les forces exercées sur la cellule par MEC, ou encore les cellules voisines).

Parmi les régulateurs de la voie Hippo figurent ainsi (Figure 26A et B) :

- des composants des complexes de polarité apico-basale tels que Scribble, Crumbs, PAR (Protease-activated receptors), Ex (Expanded), Kibra (kidney and brain expressed protein), NF2, α -caténine, AMOT (angiomotine), PTPN14 (protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14),
- les composants des complexes de polarité FAT4,
- des gardiens du phénotype épithélial tel que RASSF1A (Dubois *et al.*, 2016),
- des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR),
- des Rho (Ras homolog family) GTPases,
- des protéines du cytosquelette (Janse van Rensburg et Yang, 2016)
- la MEC (sa composition, sa densité et donc sa rigidité).

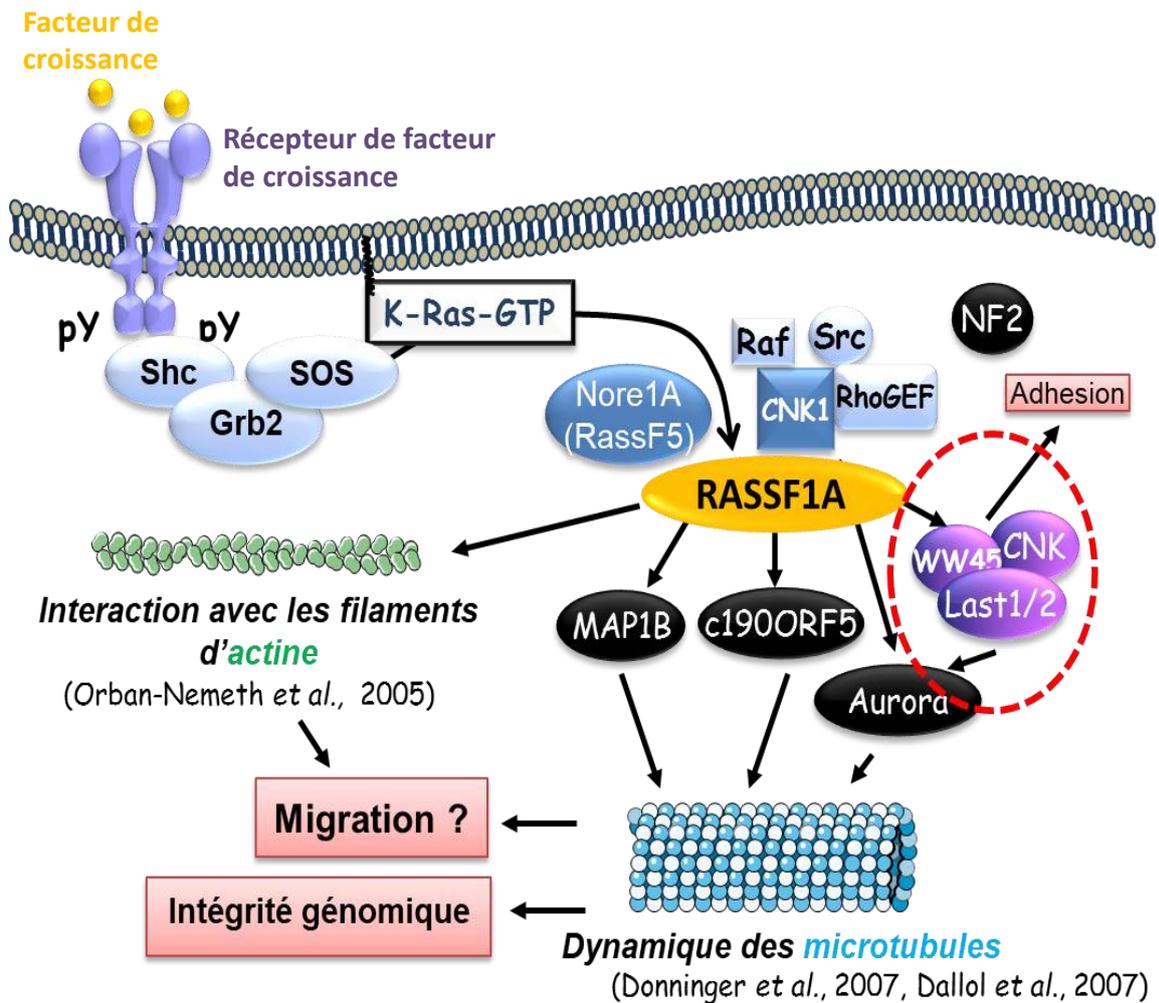


Figure 27 : RASSF1A et les filaments du cytosquelette.

En régulant la stabilité des filaments d'actine et des microtubules, RASSF1A participe à la migration cellulaire et préserve l'intégrité génomique (en assurant la bonne répartition du matériel génétique entre deux cellules filles à l'issue d'une division mitotique).

III.B.1.a. RASSF1A, protéine clé de l'homéostasie cellulaire :

Comme décrit plus haut, les protéines RASSF sont des suppresseurs de tumeurs impliquées dans un large éventail de fonctions biologiques telles que l'apoptose, l'autophagie, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la dynamique des microtubules. La famille des protéines RASSF est composée de dix membres (RASSF1-10), qui contiennent tous un domaine d'association Ras (RA) conservé. La protéine RASSF1A est la plus étudiée des membres de cette superfamille RASSF. Grâce aux nombreux domaines d'interaction qu'elle possède (présentés dans l'introduction générale), RASSF1A participe à la :

- **Stabilisation des microtubules et des filaments d'actines (Figure 27) :** La protéine RASSF1A est impliquée dans le contrôle de la polymérisation des microtubules, *via* ses interactions d'une part avec les isoformes β et γ de la tubuline (Vos *et al.*, 2004) et d'autre part avec les MAPs, des protéines associées aux microtubules connues pour promouvoir leur polymérisation (MAP1b, C19ORF5), ou leur dépolymérisation (MAP4) (Cassimeris, 1999; Halpain et Dehmelt, 2006). Les interactions de RASSF1A avec les microtubules stabilisent d'une part le cytosquelette, permettant le bon déroulement de la mitose et donc de préserver l'intégrité génomique (Arnette *et al.*, 2014).

D'autre part, en interagissant avec le cytosquelette, RASSF1A coordonne les mouvements et la formation d'extensions cellulaires *via* la kinase LATS1, avec laquelle elle interagit, et qui active des protéines d'adhésion cellulaire de la famille ERM, telle NF2 et des protéines d'adhésion inter-cellulaire (Dallol *et al.*, 2005). En régulant les kinases LATS qui elle-même régule la voie LIMK/cofiline, RASSF1A contribue également à la régulation de la polymérisation des filaments d'actine (Dubois *et al.*, 2016).

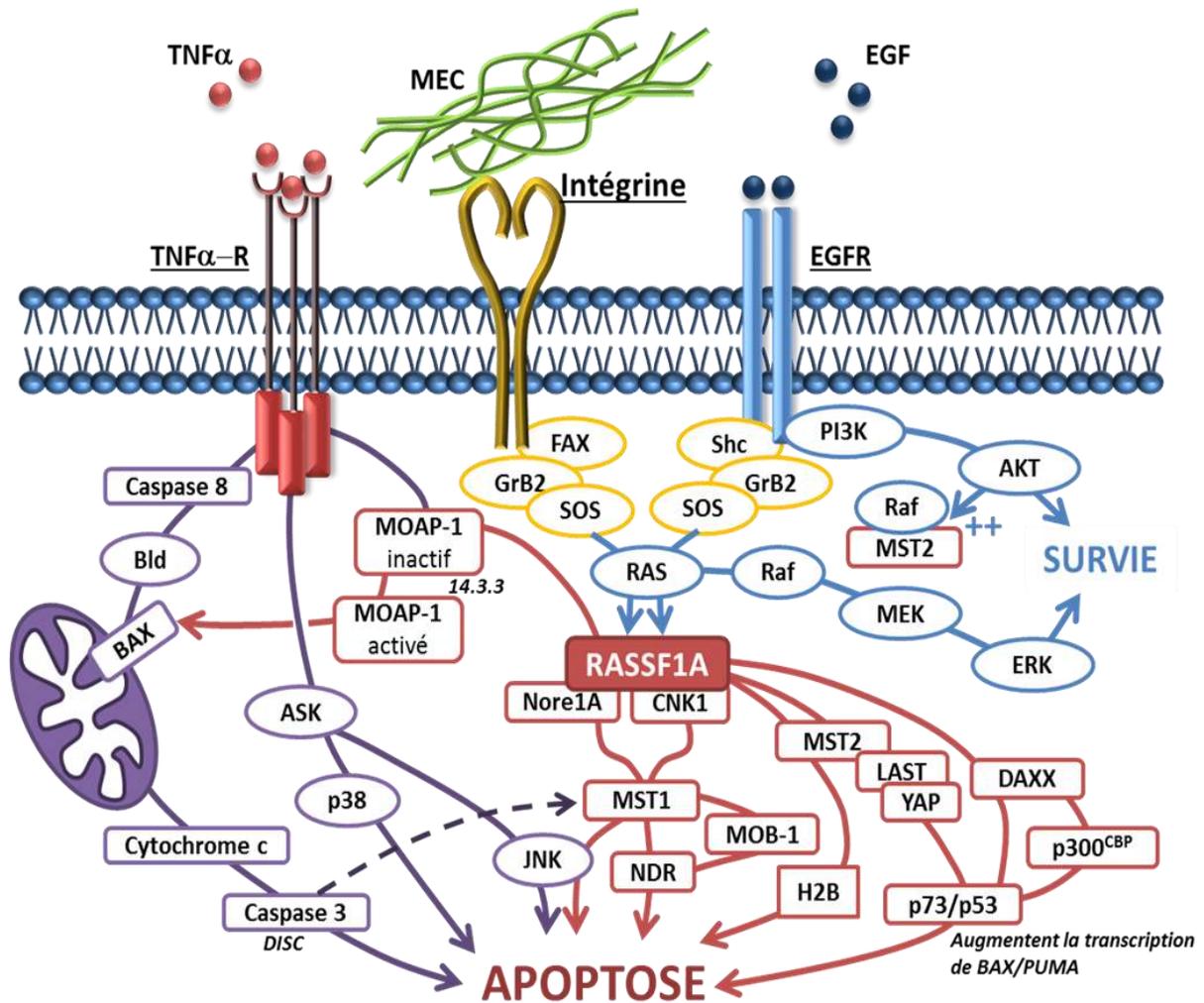


Figure 28 : RASSF1A contrôle l'apoptose cellulaire.

RASSF1A contrôle la mort cellulaire programmée *via* différentes voies de signalisation dont la voie Hippo.

- **Régulation de l'apoptose (Figure 28):**

- L'activation de RASSF1A par les récepteurs de la mort (TNFR1 et FAS) est médiée par son association avec MOAP-1 (Modulator of Apoptosis), une protéine qui se lie au domaine de mort de TNF-R1 et favorise la régulation de la protéine BH3 pro-apoptotique BAX. Après stimulation des récepteurs, RASSF1A et le MOAP-1 sont recrutés à la membrane au sein d'un complexe (Richter *et al.*, 2009), modifiant la conformation de MOAP-1, ce qui lui permet ainsi d'activer la protéine Bax (Vos *et al.*, 2006).

La protéine d'échafaudage 14.3.3 séquestre RASSF1A lorsque celle-ci est phosphorylée sur les serines 175, 178, et 179 par la serine/thréonine kinase GSK-3 β , mais l'activation de TNFR1, FAS ou TrailR1 inhibe cette association, libérant ainsi RASSF1A qui pourra alors interagir avec MOAP1 (Ghazaleh *et al.*, 2010). La mort cellulaire est ainsi déclenchée, Bax libère le cytochrome c des mitochondries, qui active alors les caspases 3, conduisant notamment à la fragmentation de l'ADN, directement ou indirectement, en clivant et activant la kinase MST1, laquelle transloquée dans le noyau, induit la fragmentation d'ADN après activation du facteur de transcription c-jun (décrit dans la partie III.B.2).

- La voie pro-apoptotique Hippo : RASSF1A peut interagir avec MST1/2 *via* leur domaine SARAH et ainsi favoriser leur l'auto-activation et les stabiliser, en empêchant leur déphosphorylation par les activités phosphatases PP2A (Protéine phosphatase de type 2A) et ainsi réguler positivement l'activité de la kinase MST1/2, les mécanismes seront décrits plus loin dans ce manuscrit (Bitra *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2011). RASSF1A module cette voie en interagissant avec la kinase pro-apoptotique MST1/2, libère la kinase RAF-1 qui à l'état basal séquestre MST. Une fois activée MST2, lie alors LATS laquelle phosphoryle YAP sur certains résidus sérine et thréonine spécifiques, lui permettant d'être transloqué dans le noyau, et de former un complexe avec p73/p53, qui favorise alors la transcription des gènes pro-apoptotiques tels Bax et PUMA (P53 up-regulated modulator of apoptosis), qui initie l'apoptose (Matallanas *et al.*, 2007; Richter *et al.*, 2009).

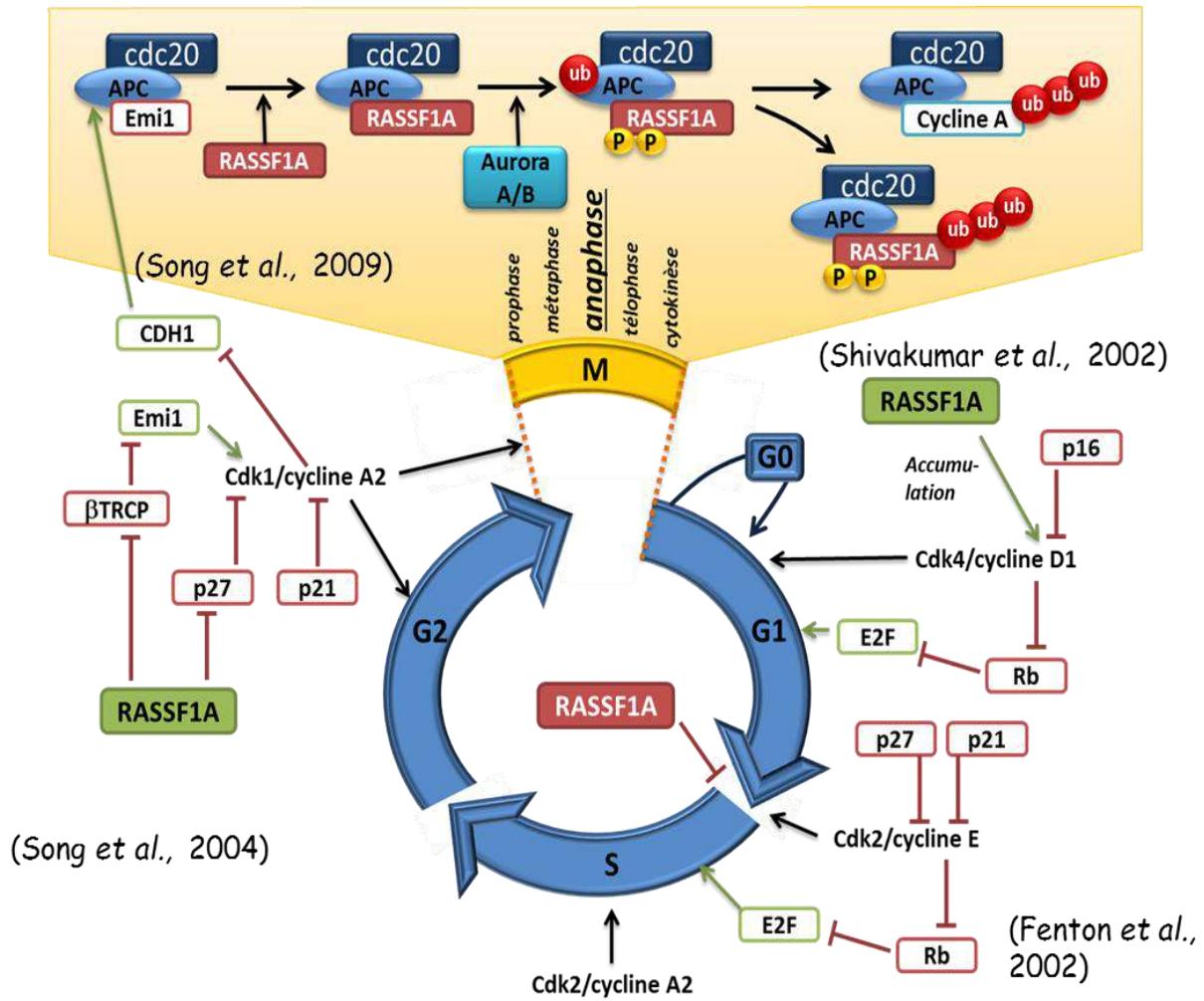


Figure 29 : RASSF1A et cycle cellulaire.

RASSF1A participe au bon déroulement des phases G1 et G2 ainsi que de la mitose.

- **Régulation de l'autophagie** : la perte d'expression de RASSF1A entraîne une sensibilité accrue des cellules aux agents dépolymérisant (Liu *et al.*, 2003), ainsi qu'une altération de la polymérisation des microtubules. Cette perte, à l'image de l'effet d'agent dépolymérisant, pourrait empêcher la maturation et les mouvements des autophagosomes associés aux microtubules puisqu'en effet les microtubules interviennent dans le transport des autophagosomes matures et jouent un rôle dans leur biogenèse et leur fusion avec les lysosomes (Fass *et al.*, 2006; Köchl *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2010). RASSF1A pourrait ainsi contrôler l'autophagie.
- **Régulation de l'adhésion et de la mobilité cellulaire** : RASSF1A apparaît être le gardien de la cytoarchitecture, de l'adhésion et de la motilité des cellules. L'interaction et la régulation de la dynamique des microtubules par RASSF1A suggèrent que c'est une protéine clef du contrôle de la mobilité cellulaire. RASSF1A inhibe en effet, l'activation pro-tumorigénique de RhoA, sa liaison directe entraîne la dégradation de RhoA par le protéasome *via* l'ubiquitine ligase E3 Smurf1 (Smad ubiquitination regulatory factor 1) (Lee *et al.*, 2016). De plus, RASSF1A est capable de diminuer l'activité des kinases SRC ce qui limiterait le phénotype pro migratoire, invasif et tumorigénique des cellules de lignées bronchiques et mammaires (Vlahov *et al.*, 2015). Enfin la présence de RASSF1A est requise pour l'activation de RhoB (Dubois *et al.*, 2016), une petite GTPase aux propriétés anti-migratoires (Bousquet *et al.*, 2009).
- **Régulation du cycle cellulaire** (Figure 29): RASSF1A intervient dans le cycle cellulaire au niveau du point de contrôle G1/S en régulant le niveau d'expression de la cycline D1 (Shivakumar *et al.*, 2002) et de la cycline A2 (Fenton *et al.*, 2004). RASSF1A agit de manière directe par interaction avec le facteur de transcription p120^{E4F} (Fenton *et al.*, 2004) et la protéine adaptatrice Cdc20. La protéine 120^{E4F} régule négativement la transcription de la cycline A2, protéine nécessaire à la transition G1-S. L'interaction de RASSF1A avec Cdc20 induit un blocage du cycle en prophase (point d'arrêt en phase M) (Song *et al.*, 2004), en l'empêchant d'activer le complexe de promotion de l'Anaphase (APC). Complexe chargé d'induire l'ubiquitination et la dégradation des cyclines A et B ainsi que de la sécurine, la protéine bloquant la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase (Song *et al.*, 2009). Le complexe APC empêche à son tour la dégradation des cyclines A et B requises pour la poursuite de la mitose (Máthé, 2004).

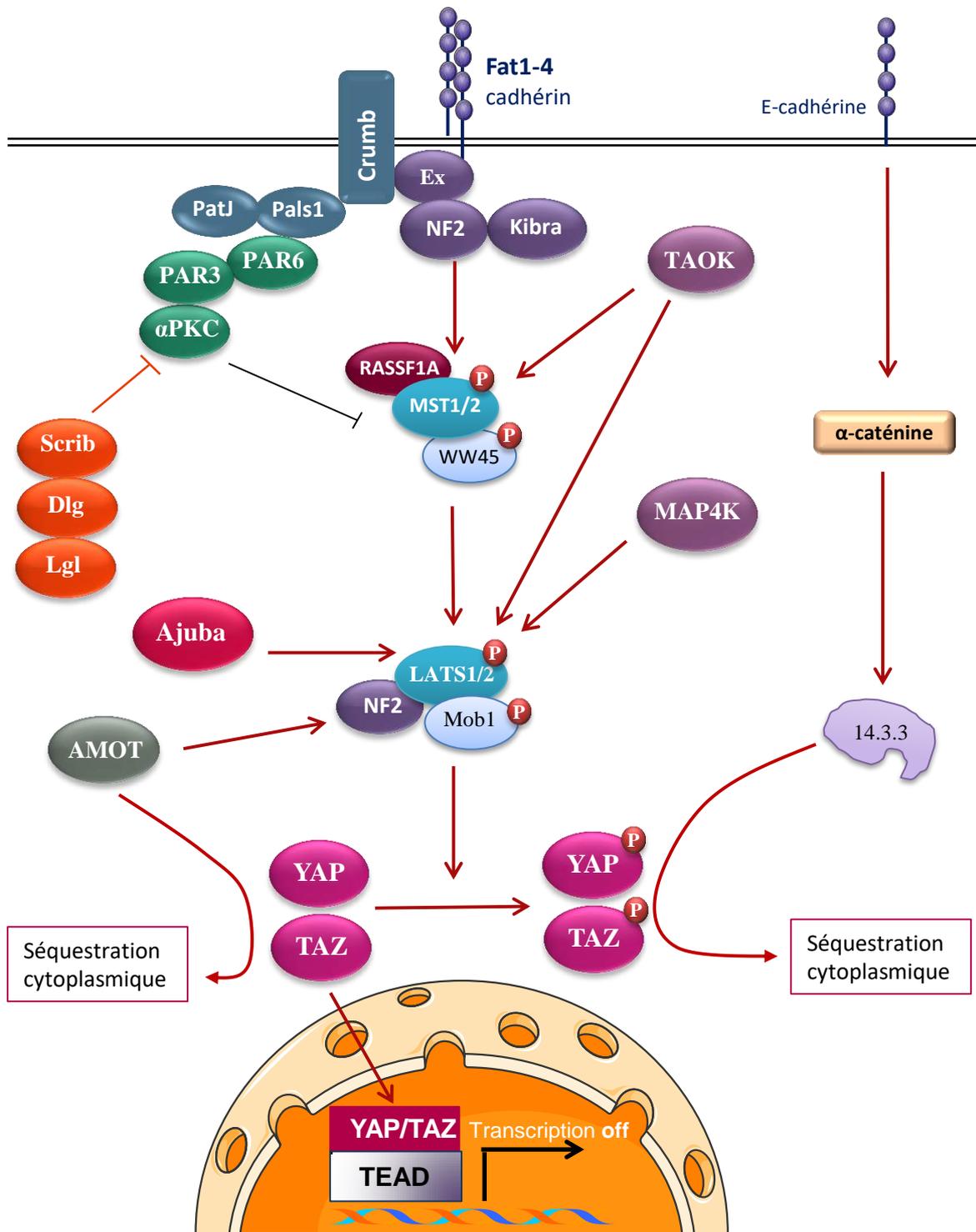


Figure 30 : Les régulateurs de la voie de signalisation Hippo.

La liaison NF2-Kibra, protéines interagissant avec une variété de voies de signalisation cellulaires, conduit à la co-localisation apicale de Kibra/Ex/NF2 et au recrutement des kinases: MST et LATS à la membrane plasmique. Activées, les kinases LATS phosphorylent YAP provoquant sa séquestration dans le cytoplasme de la cellule et son inactivité. Parmi les régulateurs figurent également les TAOK qui peuvent activer MST1/2 ou encore RASSF1A et LATS1/2. Enfin, RASSF1A/LATS2 sont également régulées par les MAP4K, Ajuba ou encore AMOT, qui peut par ailleurs, comme les protéines 14.3.3., empêcher la translocation nucléaire de YAP et TAZ et les séquestrer dans le cytoplasme (Adapté de Zygulska *et al.*, 2017).

III.B.1.b. Autres régulateurs de la voie Hippo :

Concernant les régulations à l'échelle de MST1/2, il a été montré que (Figure 30) :

- Les **TAOK1-3** (thousand-and-one amino acids kinase), peuvent activer directement MST1/2 (Thr183 pour MST1 et Thr180 pour MST2). Ces TAOK contribuent ainsi au contrôle de l'activité de YAP : en effet, lorsque TAOK1 est exprimée conjointement avec les protéines LATS1, WW45 et MST2, l'activité de YAP est presque nulle. Les TAOK régulent également les kinases MST1/2 indirectement en contrôlant l'organisation du cytosquelette *via* la régulation qu'elles exercent sur les MAPK p38 et JNK (Jun N-terminal Kinase) : ces TAOK sont en effet des MAP3K (mitogen-activated protein 3kinase), capable de phosphorylation directe de MAP2K3 et de MAP2K6, ce qui conduit à l'activation des MAPK p38. TAOK3 (ou JIK) est également capable d'inhiber l'activation de JNK (Boggiano *et al.*, 2011; Poon *et al.*, 2011; Zygulska *et al.*, 2017).
- Le complexe **Ex-Kibra-NF2** interagit avec MST1/2 indirectement *via* WW45 et permet son activation en la confinant à la membrane plasmique. La protéine **Fat1-4** est une cadhérine atypique indispensable à la localisation de la protéine **Ex** (FRMD6/Willin) aux jonctions apicales (Deel *et al.*, 2015). Celle-ci *via* son domaine FERM se lie à son tour avec NF2-Kibra. Kibra, facilite l'association NF2/Ex toutes deux liées par leur domaine FERM et stimule la phosphorylation de motifs hydrophobes de LATS1/2 (Genevet *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2010) ce qui conduit à la co-localisation apicale du complexe Ex-Kibra-NF2, au recrutement des kinases MST1/2 et LATS1/2 à la membrane plasmique et ainsi à l'activation de la voie Hippo.
- Le complexe **Crumbs**, localisé au niveau des jonctions serrées est constitué de 4 protéines principales : **Crb1-3, Pals1, PatJ et Lin-7**. La protéine Crumbs, transmembranaire, interagit avec la protéine Ex *via* leur domaine FERM, conduisant à l'activation de MST1/2 et par conséquent régulant la localisation et la phosphorylation de YAP/TAZ (Varelas *et al.*, 2010). Comme l'assemblage du complexe Crumbs se produit avec la formation de contacts cellule-cellule et la maturation des structures de jonction, l'activation de la voie Hippo est couplée à la détection de densité cellulaire. En effet, récemment il est rapporté que la protéine Crb3 agit comme un régulateur en amont de la voie Hippo, en recrutant d'autres molécules Hippo, telles que Kibra et/ou Ex afin de réguler l'inhibition de contact (Mao *et al.*, 2017).

- **Le complexe PAR**, constitué de PAR3 PAR6 et aPKC (atypical protein kinase C) interagit avec le complexe Crumbs *via* PAR6 et régule la voie Hippo par son interaction avec MST1/2. L'aPKC inhibe l'activation de MST1/2 et par conséquent favorise la localisation nucléaire de YAP/TAZ. PAR3 peut activer TAZ en induisant la déphosphorylation et l'inactivation de LATS1 par son interaction avec de la protéine phosphatase 1(PP1) (Lv *et al.*, 2015).
- **Le complexe Scribble** (SCRIB/DLG/LGL), gardien de l'intégrité du domaine basolatéral indispensable à l'établissement des jonctions intercellulaires, a un effet inhibiteur sur le complexe PAR. La perte de Scrib entraîne une localisation nucléaire de YAP et donc son activation (Yang *et al.*, 2015a)
- **AKT, ABL et mTOR** peuvent également phosphoryler MST1/2 et moduler son activité (Zygulska *et al.*, 2017).

Concernant les régulations des kinases LATS1/2 et des cofacteurs YAP/TAZ, il a été rapporté que (Figure 30) :

- les **TAOK1/3** peuvent activer directement LATS1/2 en les phosphorylant et ainsi inhiber YAP/TAZ indépendamment de MST1/2 et des MAP4Ks (Plouffe *et al.*, 2016).
- Les **MAP4Ks** sont des régulateurs physiologiques de LATS1/2 et YAP/TAZ en réponse à un certain nombre de signaux en amont. **MAP4K4/6/7** et **MAP4K1/2/3/5** phosphorylent et activent LATS1/2 sur leurs motifs hydrophobes. La phosphorylation de LATS1/2 par MAP4K4/6/7 nécessite NF2. Les MAP4Ks, composants de la voie Hippo élargie, agissent en parallèle des kinases MST1/2 et sont partiellement redondants dans la régulation de LATS1/2 et YAP/TAZ (Meng *et al.*, 2015).
- **NF2**, régulateur en amont de la voie Hippo, interagit directement avec les kinases LATS1/2 *via* son domaine FERM et les positionnent physiquement pour faciliter leur phosphorylation par MST1/2 (Yin *et al.*, 2013).
- La protéine **Kibra** peut s'associer et activer les kinases LATS1/2 en stimulant leur phosphorylation sur le motif hydrophobe. Kibra stabilise LATS2 en inhibant son ubiquitination. Dans certaines cellules humaines, Kibra peut donc réguler l'activité de la signalisation Hippo de deux façons : MST1/2-dépendante (par association avec NF2) et MST1/2 indépendant (directement *via* LATS1/2) (Wilson *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2011).

D'autres régulateurs interagissent avec Kibra, notamment **PTPN14**, un autre composant des jonctions adhérentes qui interagit et déphosphoryle la β -caténine. PTPN14 est un régulateur négatif de YAP qui peut supprimer son activité en contrôlant sa localisation (cytoplasmique) en formant un complexe stable avec YAP, médié par des motifs PPxY et WW respectivement (Michaloglou *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012). PTPN14 peut aussi activer LATS1 indépendamment ou en coopération avec Kibra mais non-dépendant des kinases MST1/2 (Wilson *et al.*, 2014).

- Les protéines **AMOT**, une famille de protéines d'échafaudage connue pour réguler la croissance cellulaire et l'établissement de la polarité, ont été identifiées comme des régulateurs négatifs indirects ou directs des effecteurs YAP et TAZ. Le recrutement au niveau des jonctions serrées et du cytosquelette d'actine de LATS1/2 et YAP/TAZ favorise leur phosphorylation et empêche leur translocation nucléaire. L'interaction directe se fait *via* le domaine WW de YAP/TAZ et PPxY des protéines AMOT, indépendamment de leur phosphorylation (Chan *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). AMOT peut également fonctionner comme un activateur en amont de NF2 dépendant du contact cellulaire, *via* un mécanisme régulé par la phosphorylation (Ser518). AMOT peut se lier directement à la conformation auto-inhibée de NF2 et ainsi la libérer favorisant la liaison de NF2 à LATS1/2 et par conséquent l'activation de la voie Hippo (Li *et al.*, 2015b).

- **Ajuba** interagit avec les kinases LATS1/2 et WW45 pour phosphoryler YAP/TAZ (Jagannathan *et al.*, 2016). Une étude a démontré dans des lignées cellulaires de mésothéliome dépourvues d'Ajuba, un niveau plus déphosphorylé (activé) de YAP, ce qui indique que Ajuba régule négativement l'activité de YAP à travers la famille LATS. Son inactivation est un nouveau mécanisme clé dans le contrôle de la prolifération des cellules mésothéliales (Tanaka *et al.*, 2015). Ajuba fait partie d'une famille de protéines à domaine LIM comprenant la Zyxine, WTIP, LIMD1, LPP et TRIP6 qui semblent toutes interagir avec les kinases LATS. TRIP6 constitue notamment un intermédiaire de signalisation mis en jeu dans la mechano-transduction (le contrôle par YAP de la prolifération en fonction de la tension mécanique induite par l'environnement cellulaire) (Dutta *et al.*, 2018).

- **L' α -caténine**, composant des jonctions adhérentes reliant les cadhérines membranaires au cytosquelette d'actine à un rôle inhibiteur sur l'activité YAP par contrôle de sa localisation. La forte interaction de YAP avec l' α -caténine est médiée par la protéine 14-3-3 qui se lie uniquement au YAP phosphorylé sur l'une ou la totalité de cinq résidus serines critiques. YAP est séquestré aux jonctions adhérentes par le complexe trimérique : α -caténine,

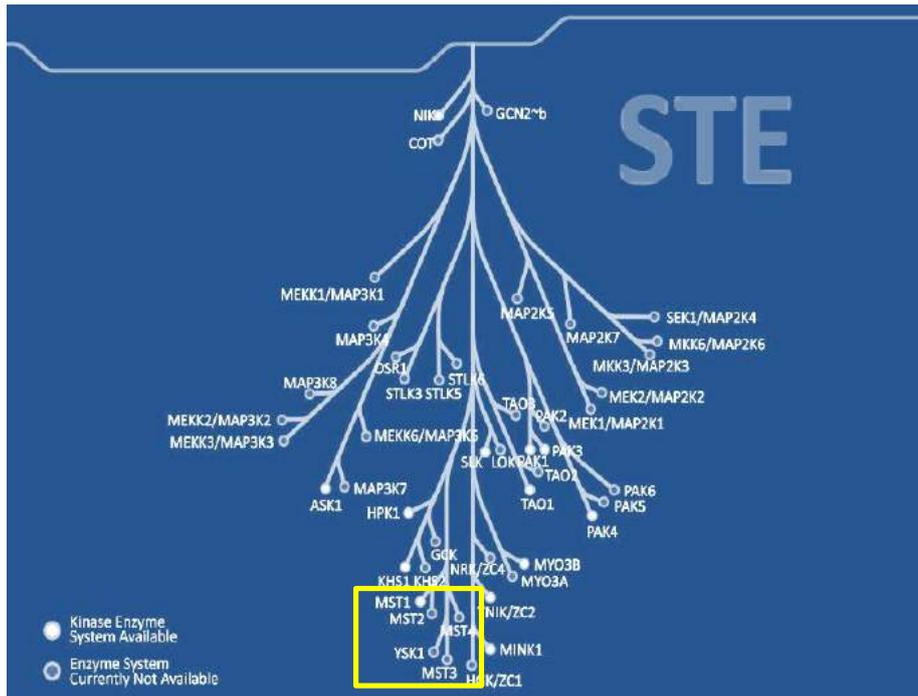
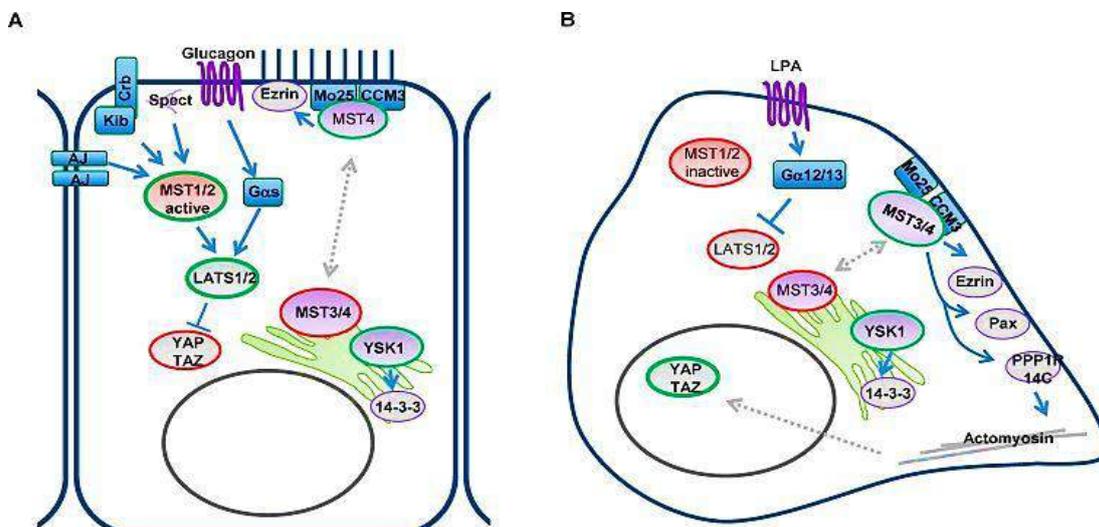


Figure 31 : Les kinases STE.

Le kinome humain présente une grande branche de kinase dites "STE", nommées d'après la kinase Sterile20 de levure. Cette superfamille STE comprend plusieurs sous-familles, dont la famille MST (<https://france.promega.com/resources/tools/kinome>).



Cellules épithéliales différenciées (homéostasie) :

- MST1/2 activées *via* les complexes jonctionnels et de polarité
- YAP/TAZ inactifs : inhibition de la prolifération.
- MST3/4 sont séquestrées dans le Golgi.
- MST4 maintient la polarité baso-apicale
- YSK1 maintient la polarité du Golgi.

Lors d'une blessure ou dans les cancers :

- La perte des complexes jonctionnels et de la polarité réduit l'activité de MST1/2
- YAP/TAZ actifs: activation de la prolifération.
- MST3/4 coordonnent la phosphorylation des régulateurs du cytosquelette et de la motilité cellulaire.
- YSK1 maintient la polarité du Golgi.

Figure 32: Rôles des kinases MST dans l'homéostasie, la cicatrisation et la carcinogénèse.

Les molécules actives sont représentées en verts et les molécules inactives en rouges (d'après Thompson *et al.*, 2015).

14-3-3 et YAP, qui empêche la déphosphorylation/activation de YAP et son accumulation nucléaire (Li *et al.*, 2016a; Schlegelmilch *et al.*, 2011).

En plus des protéines modulant la voie Hippo décrites ci-dessus, d'autres protéines requises pour l'établissement et/ou le maintien de la polarité apico-basale modulent l'activité de YAP :

- **la E-cadhérine** qui induit l'adhésion cellulaire par sa liaison homophile (Kim *et al.*, 2016) ;
- **LKB1** (Liver kinase B1) est capable d'induire la phosphorylation de YAP et sa dégradation par le protéasome (Nguyen *et al.*, 2013).
- **NPHP4** (Nephronophthisis 4) peut interagir et inhiber LATS1 et déstabiliser la liaison de 14.3.3 avec YAP/TAZ favorisant leur translocation nucléaire (Habbig *et al.*, 2011).
- **ZO-1** (Zonula occludens-1) réprime l'activation de TAZ (Remue *et al.*, 2010) alors que **ZO-2** induit la localisation nucléaire de YAP *via* son domaine PDZ (Oka *et al.*, 2010).

III.B.2. Le cœur de la voie Hippo : MST1/2 et LATS1/2 et leurs adaptateurs

III.B.2.a. [Les kinases MST et leur protéine adaptatrice WW45](#)

➤ Les Kinases MST

La famille des MST comprend cinq protéines apparentées chez le mammifère : **MST1** (STK4), **MST2** (STK3), **MST3** (STK24), **MST4** (STK26) et **YSK1** (STK25 ou SOK1). Ces kinases sont des membres de la superfamille "**STE**" (Figure 31) (Creasy and Chernoff, 1995).

Les cinq kinases MST sont divisées en deux sous-groupes : MST1/2 et MST3/4/YSK1.

Les kinases MST1/2 sont étroitement apparentées (76% d'homologie) et largement exprimées dans les tissus humains (Xu *et al.*, 2013), elles sont structurellement et fonctionnellement distinctes de MST3/MST4/YSK1, ce qui leur confère des rôles distincts (Figure 32).

MST1/2 sont davantage impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire, l'apoptose et régulent la migration, tandis que MST3/MST4/YSK1 jouent quant à elles un rôle important dans la distribution du cytosquelette (donc dans le contrôle des mouvements cellulaires, MST3/4 contrôlant l'activité des ERM et de la paxiline (Gloerich *et al.*, 2012)), la polarité cellulaire (YSK-1 ayant la protéine 14.3.3 comme son substrat (Preisinger *et al.*, 2004)) et dans l'organisation de l'appareil de Golgi (Thompson et Sahai, 2015).

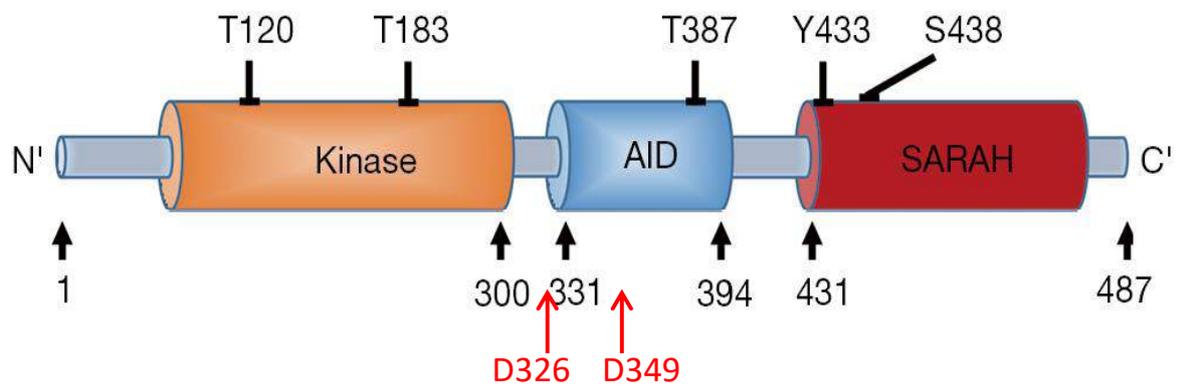


Figure 33 : Structure des kinases MST.

Les kinases MST possèdent 3 domaines fonctionnels: un domaine kinasique (en orange), un domaine auto-inhibiteur (en bleu), et un domaine SARAH (en rouge), ainsi que différents résidus sérine, thréonine et tyrosine phosphorylables et 2 sites de clivage par les caspases (d'après Cai *et al.* 2016).

MST1 et MST2 sont les mieux caractérisées des kinases MST, elles sont toutes deux composées (Figure 33) :

- d'un **domaine kinase N-terminal**,
- d'une **région régulatrice C-terminale** pouvant être divisée en deux domaines fonctionnels :
 - un **domaine auto-inhibiteur**
 - et un **domaine de dimérisation** en hélice enroulée (coiled-coil) : le domaine SARAH (Creasy *et al.*, 1996).

Ces kinases possèdent également **2 sites de clivage** par les caspases et **5 sites de phosphorylation**. Le segment reliant le domaine catalytique au domaine SARAH n'est pas complètement connu, ses caractéristiques principales comprennent un motif de clivage de la caspase 3 (D326 pour MST1 et D322 pour MST2) et en position plus distale, un motif de clivage de la caspase 6/7 (D349) présent dans MST1 seulement (Galan et Avruch, 2016). Chez l'homme, MST1 et MST2 sont constituées respectivement de 487 et 491 acides aminés, leur domaines catalytiques sont identiques à plus de 95% (Galan and Avruch, 2016).

L'activité de MST1 est régulée par phosphorylation des résidus thréonine (T120, T183, T387), du résidu tyrosine (Y433) et du résidu sérine (S438) (Figure 33). La kinase MST1 sera activée par la phosphorylation accrue des T183 et Y433 et inhibée après la phosphorylation des T120, T387 et S438 (Cai *et al.*, 2016).

Les kinases MST peuvent être inactivées par déphosphorylation des S/T activatrices par les phosphatases PP1/PP2A (Guo *et al.*, 2011; Sánchez-Sanz *et al.*, 2016), ou les phosphatases PHLPP1/2 (Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase) (Jung *et al.*, 2014).

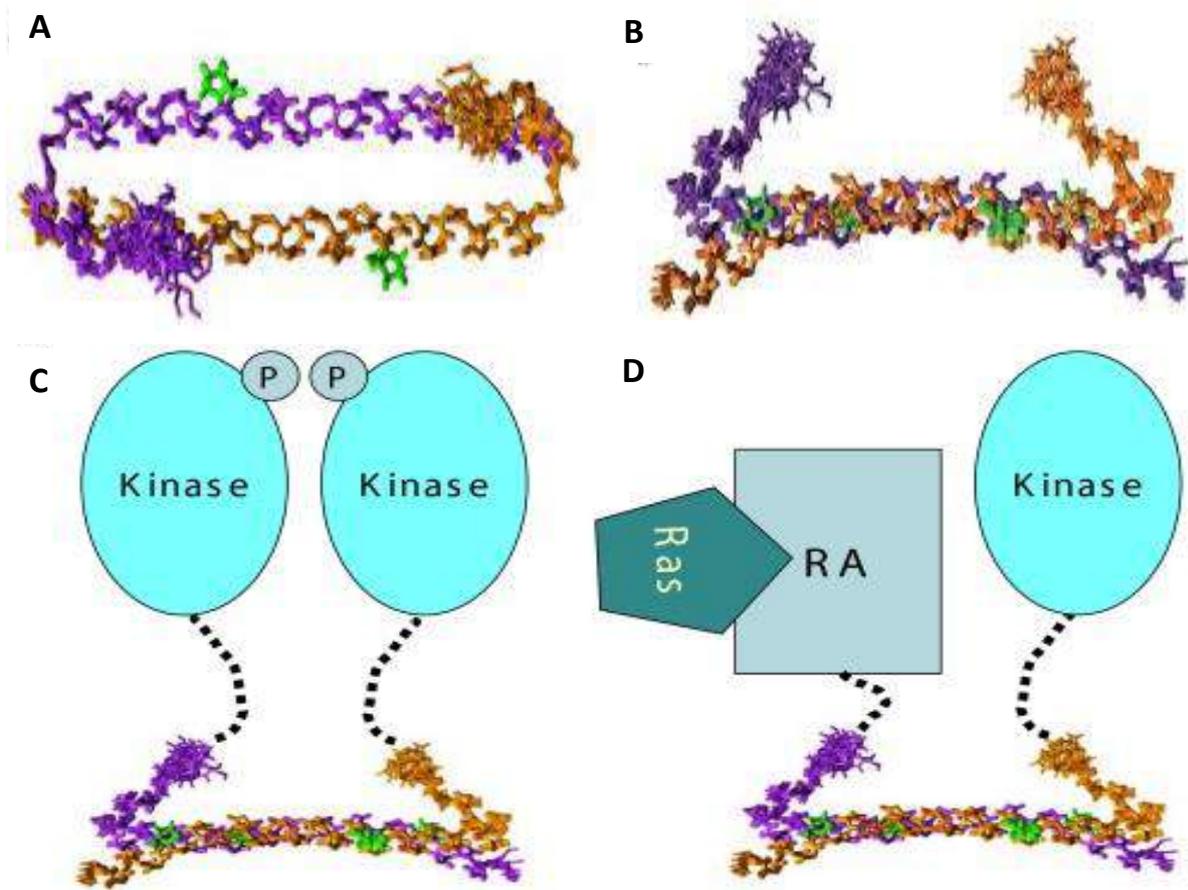


Figure 34 : Structure du domaine SARAH de MST1 (résidus 432-480), interaction homotypique de MST1 et interaction hétérotypique de MST1 avec les protéines RASSF.

(A) Le dimère de MST1 SARAH humain, les deux monomères sont respectivement de couleur magenta et orange. Les résidus de proline sont en verts. (B) Structure A tournée de 90 ° autour d'un axe horizontal. (C) Le domaine kinase MST1 est lié au dimère SARAH à travers un lieu flexible, permettant l'autophosphorylation. (D) Le domaine d'association Ras de la famille RASSF lié à leur domaine SARAH intervient dans l'interaction hétérotypique avec les kinases MST. Cette interaction peut induire la co-localisation de suppresseurs de tumeurs de la famille RASSF avec des kinases MST dans l'apoptose (Hwang *et al.*, 2007).

Le domaine SARAH de MST1/2 contribue également à l'activité de ces protéines car il leur permet de s'homo- ou s'hétérodimériser et ainsi les stabilisent.

Le monomère MST1, relativement instable, comprend deux hélices :

- une hélice courte en N-terminale (résidus 433-437), nommée **h1**
- une hélice longue en C-terminale (résidus 441-480), nommée **h2**.

L'homodimérisation de MST1 crée une paire très stable de longues hélices antiparallèles (h2/h2') fournissant une interface de liaison entre les deux monomères, et l'hélice courte d'un monomère est recourbée vers l'hélice longue opposée. Les interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et les interactions électrostatiques entre les hélices stabilisent l'interface du dimère (Hwang *et al.*, 2007) (Figure 34).

Les kinases MST n'agissent pas uniquement dans le cadre de la signalisation Hippo, elles interagissent et régulent également d'autres partenaires que les kinases LATS leur permettant ainsi de participer également à la régulation de l'apoptose (Matallanas *et al.*, 2007), du cycle cellulaire, de la duplication des centrosomes (Hergovich *et al.*, 2009), de la mitose (Chiba *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2007; Praskova *et al.*, 2008) et de la migration cellulaire notamment des lymphocytes (Katagiri *et al.*, 2009).

Concernant MST1, qui fait plus particulièrement en partie l'objet de cette thèse, il a ainsi été démontré que cette kinase participe à la :

- **Régulation de la mort cellulaire**
 - [MST1 et apoptose](#)

MST1 contrôle l'apoptose *via* des mécanismes caspase-dépendant et caspase-indépendant. Elle est reconnue dans la littérature principalement comme étant une kinase pro-apoptotique (Creasy et Chernoff, 1995; Servas *et al.*, 2017).

Au cours de l'apoptose, induite par un stress cellulaire ou la stimulation des récepteurs de mort cellulaire tel que FAS, les kinases MST1/2 sont clivées par les caspases activées, ce qui génère des protéines actives tronquées sans site d'autophosphorylation ni domaine SARAH (Graves *et al.*, 1998). MST1 ainsi clivée phosphoryle l'histone H2AX, ce qui est essentiel pour la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN pendant l'apoptose (Wen *et al.*, 2010).

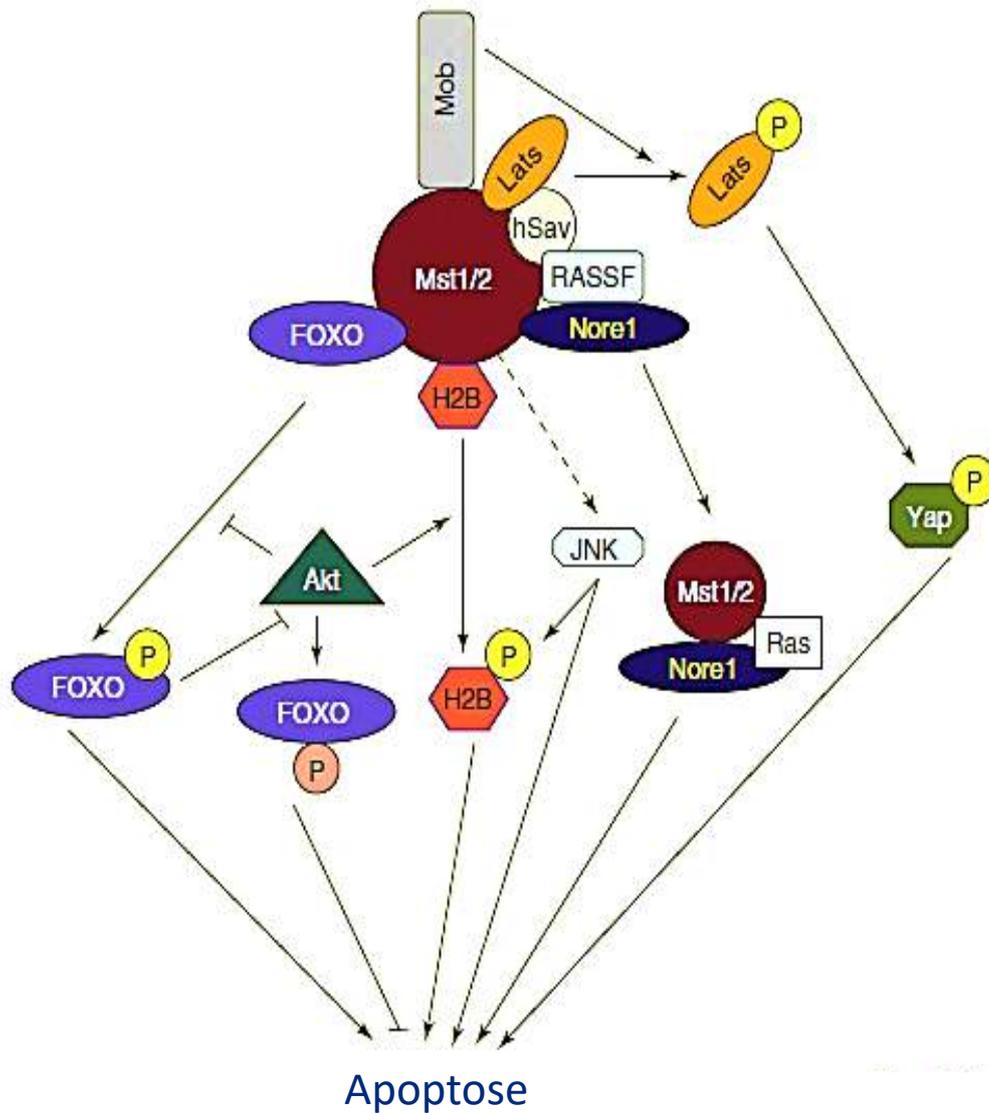


Figure 35 : Multiple voies de signalisation apoptotique médiées par les cibles des kinases MST.

Le complexe Ras-Nore1-MST régule l'apoptose directement ou en agissant sur des intermédiaires, substrats de MST1 dont FOXO, H2B, JNK ou LATS. AKT module l'apoptose induite par les kinases MST (d'après Radu et Chernoff, 2009).

Les kinases MST peuvent également réguler l'apoptose *via* :

- **Les protéines RASSF1-6** : non clivées, les kinases MST1/2 peuvent s'hétérodimériser à ces protéines par leur domaine SARAH. MST1 inactive, liée à RASSF1A *via* son domaine SARAH est phosphorylée (T183) et activée par l'association de la protéine pro-apoptotique CNK1 (Connector enhancer of kinase suppressor of ras 1), après la stimulation des récepteurs de mort (FAS activés) (Oh *et al.*, 2006; Rabizadeh *et al.*, 2004). MST peut ainsi accélérer l'activation des caspases 3 par phosphorylation des régulateurs pro et anti-apoptotiques de caspase (Graves *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001). De plus, après l'activation des récepteurs de mort, la caspase 3 activée clive à son tour MST1 associée à RASSF1A, conduisant à un mécanisme d'activation de MST1 cette fois-ci caspase-dépendant (Song *et al.*, 2008).
- **La protéine p53** : MST1 peut favoriser l'apoptose *via* p53 après dommages de l'ADN. En effet, MST1 augmente l'acétylation de p53 et la transactivation en inhibant la désacétylation de Sirtuin 1 (Sirt1) et son interaction avec p53. Sirt1 peut en effet être phosphorylée par MST1 conduisant à l'inhibition de son activité (Yuan *et al.*, 2011). Enfin, la combinaison du modulateur de kinase, DAP4 (Death Associated Protein-4), avec MST1/2 dans le noyau peut déclencher l'apoptose en permettant leur colocalisation avec p53 (Lin *et al.*, 2002).
- **FOXO (Figure 35)** : Les facteurs de transcription FOXO sont des substrats des kinases MST. Non clivée, MST1 phosphoryle FOXO au niveau d'un résidu sérine conservé (Ser 207 pour FOXO3 et Ser 212 pour FOXO1) (Lehtinen *et al.*, 2006; Yuan *et al.*, 2009). Ainsi phosphorylé par MST1, FOXO se lie à 14-3-3, ce qui empêche sa translocation nucléaire et l'activation d'un certain nombre de gènes pro-apoptotiques (Yuan *et al.*, 2009). Déphosphorylé et libre de 14-3-3, FOXO conduit à la mort cellulaire des cellules neuronales des mammifères en réponse au stress oxydatif (Lehtinen *et al.*, 2006). La kinase AKT module les activités pro-apoptotiques de MST : en effet AKT phosphoryle MST1, ce qui empêche son activation par clivage des caspases de MST1 (Jang *et al.*, 2007). MST1 peut à l'inverse inhiber AKT par phosphorylation directe et ainsi contrôler la voie de signalisation PI3K/AKT (Cinar *et al.*, 2007).
- **Bcl-xL** : En condition de stress cellulaire, dans des cardiomyocytes, MST1 phosphoryle Bcl-xL un membre de la famille Bcl-2 qui agit de manière anti-

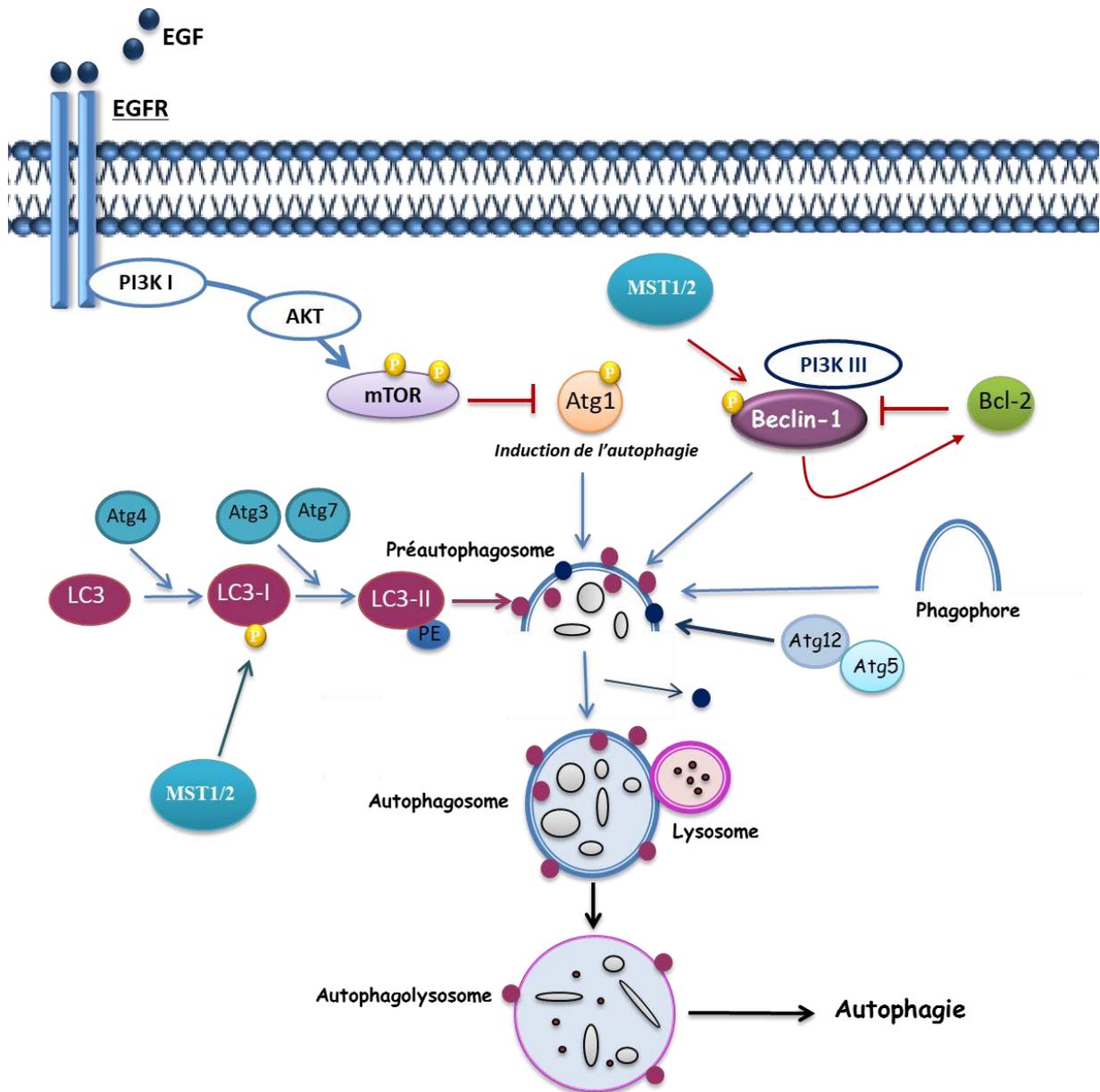


Figure 36 : Les mécanismes moléculaires de l'autophagie.

L'autophagie est régulée par plusieurs facteurs : la protéine anti-apoptotique Bcl-2 l'inhibe alors que le complexe PI3KIII (Vsp34)-Beclin-1, la protéine LC3 et le complexe Atg5-Atg12 permettent son initiation par la mise en place du pré-autophagosome. MST1 peut selon son action inhiber (phosphorylation de Beclin-1) ou favoriser ce processus (phosphorylation de LC3). Les flèches en rouge représentent l'inhibition et celles en bleu, l'activation/initiation de l'autophagie.

apoptotique en interagissant avec Bax et Bak. Cette phosphorylation bloque les interactions Bcl-xL/Bax ce qui induit l'activation de Bax et donc la mort apoptotique (Del Re *et al.*, 2014; Nakamura *et al.*, 2016).

- [MST1 et Autophagie](#)

L'autophagie est un processus catabolique conservé au cours de l'évolution qui joue un rôle crucial dans l'homéostasie cellulaire en facilitant la dégradation lysosomale des composants cytosoliques tels que les macromolécules et les organelles défectueuses (Levine et Klionsky, 2004).

Ce processus comprend une série d'événements complexes dans lesquels le matériel cytosolique est séquestré dans des vésicules à membrane double appelées autophagosomes, qui fusionnent ensuite avec les lysosomes acides pour former des autolysosomes, où le contenu de ces vésicules est dégradé et recyclé. Ces différentes étapes sont orchestrées par un groupe de protéines : Atg (Autophagy genes), se complexant les unes avec les autres et s'associant transitoirement avec la membrane pré-autophagosomale et celle de l'autophagosome, ces protéines étant recrutées dans le cytoplasme.

Wilkinson et collaborateurs, rapportent que les deux kinases MST1/2 peuvent réguler l'autophagie par phosphorylation directe de LC3 (Light Chain 3) sur sa thréonine 50, LC3 est une protéine clé dans la formation des autophagosomes (Wilkinson et Hansen, 2015) en jouant un rôle critique lors du recrutement, la biogenèse et l'achèvement de l'autophagosome (Figure 36). La perte de phosphorylation de LC3 bloque le processus d'autophagie en altérant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Wilkinson *et al.*, 2015).

La perte de MST1/2 altère l'autophagie dans une grande variété d'espèces, indiquant que ces kinases sont des régulateurs conservés de l'autophagie (Wilkinson *et al.*, 2015).

De plus, Maejima et collaborateurs ont montré que MST1 peut bloquer l'autophagie en phosphorylant directement Beclin1 (nécessaire à l'activation de l'autophagie) dans un modèle murin d'infarctus du myocarde. Ainsi, au cours du stress cellulaire, MST1 activée peut phosphoryler Beclin1 (domaine BH3) sur la thréonine-108, conduisant à la séparation de Beclin-1 du complexe Atg14L-Vps34 (Maejima *et al.*, 2013). Beclin1 dissociée entre ensuite en compétition avec Bax pour interagir avec Bcl-2, supprimant l'autophagie et entraînant l'accumulation d'agrégats de protéines (Figure 36). Bax non liée se déplacera vers les mitochondries déclenchant des perturbations mitochondriales, conduisant au relargage du cytochrome c et à l'activation de la caspase et ainsi entraînant l'apoptose (Cai *et al.*, 2016),

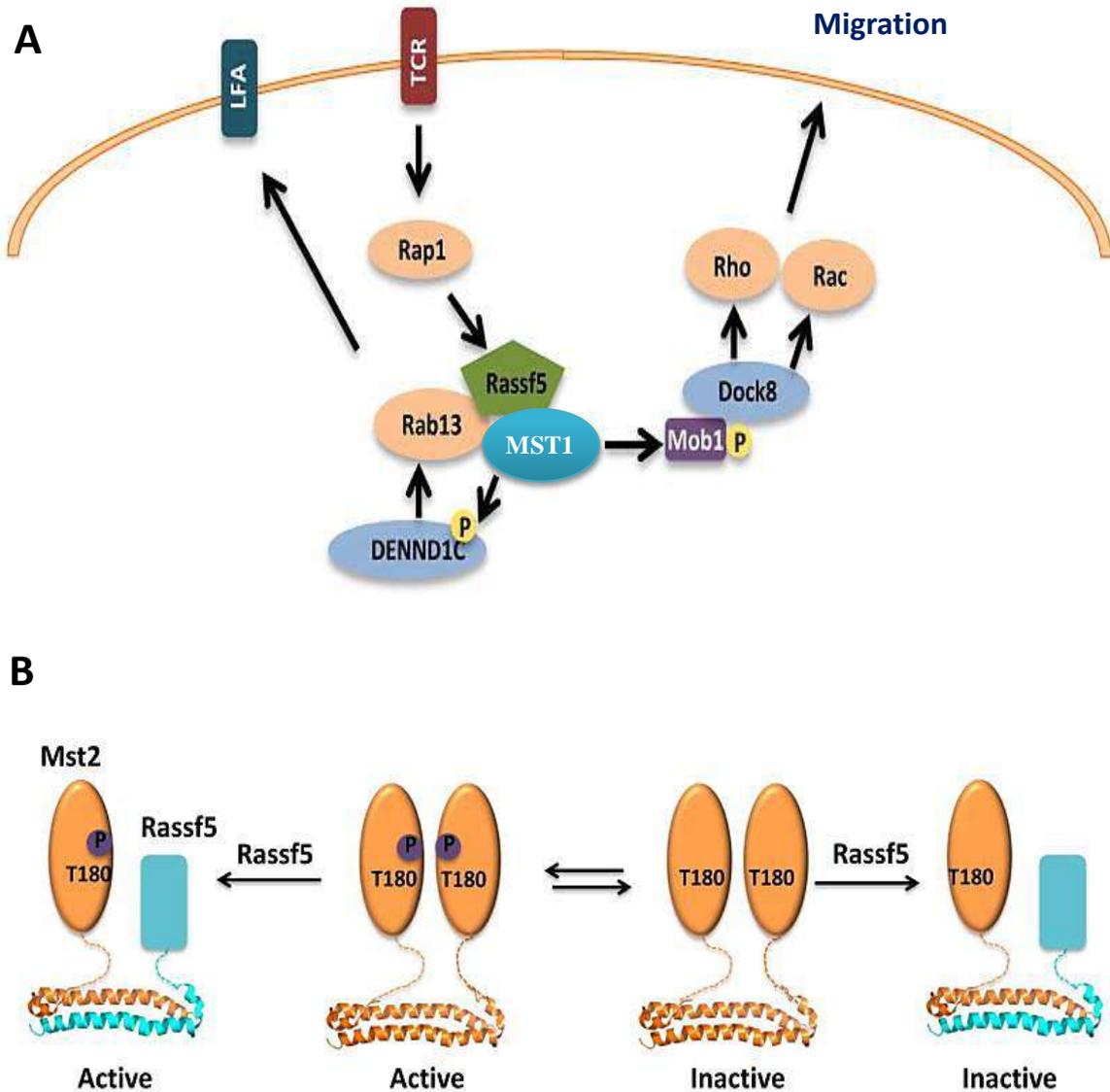


Figure 37 : Signalisation MST1 dans les lymphocytes indépendante de la voie Hippo.
A) La kinase MST1 est activée en amont par les chimiokines et le récepteur des lymphocytes T (TCR). Ces signaux sont propagés par l'activation de la petite GTPase Rap1, qui se lie à l'adaptateur de protéine RASSF5 qui contient un domaine SARAH permettant l'interaction avec MST1. MST1 activée peut phosphoryler le facteur d'échange guanine-nucléotide (GEF) de DENND1C, conduisant à l'activation de la petite GTPase Rab13, et à l'agrégation de l'intégrine LFA-1. MST1 favorise également la migration cellulaire en phosphorylant GEF Dock8 et Rac/Rho (d'après Rawat and Chernoff, 2015).
B) RASSF5 régule l'activation de MST1 : si RASSF5 se lie à MST1 inactive, RASSF5 prévient son activation. Si RASSF5 se lie à MST1 active, RASSF5 prévient son inactivation (d'après Rawat et Chernoff, 2015).

suggérant donc l'existence dans la cellule d'une régulation réciproque de l'autophagie et de l'apoptose faisant intervenir les kinases MST.

Comprendre les signaux qui régulent l'activation de tous ces programmes de mort cellulaire par MST1/2 pourrait avoir un impact majeur sur le traitement de différentes pathologies.

- **Régulation de la prolifération cellulaire et de la migration**

MST1 pourrait jouer un rôle dans l'immunité. En effet, il a été rapporté chez des souris déficientes en MST1 et chez des patients portant une mutation de MST1, une fonction immunitaire altérée avec une susceptibilité accrue aux infections bactériennes et virales (Abdollahpour *et al.*, 2012). Les auteurs décrivent un nouveau syndrome d'immunodéficience primaire chez l'homme causé par une mutation non-sens homozygote de MST1.

Ces données sont en accord avec une autre étude qui montre un déséquilibre de la signalisation des lymphocytes T en l'absence de MST1, par une augmentation de l'apoptose et donc une diminution du nombre de lymphocytes T, avec un rôle de la voie MST1/FOXO1 dans le contrôle de la mort des cellules T naïves humaines (Nehme *et al.*, 2012).

Dans les lymphocytes T, MST1 est en effet activée suite à la liaison de chimiokines à leurs récepteurs et/ou du récepteur des lymphocytes T (TCR) via la petite GTPase Rap1 qui se lie à MST1 par l'interaction avec RASSF5. Le complexe MST1/RASSF5/Rap1 active Rab13 qui contribue à regrouper en « cluster » l'intégrine LFA-1 à certains endroits de la membrane plasmique (Katagiri *et al.*, 2009) (Figure 37). MST1 peut en parallèle promouvoir la migration des lymphocytes en phosphorylant, *via* Mob1, la GEF Dock8, qui active les protéines de la famille Rho et Rac, qui sont des protéines clés du mouvement cellulaire (Rawat et Chernoff, 2015).

L'immunodéficience associée à la perte de MST1 chez les mammifères pourrait également être liée à sa fonction dans l'autophagie, avec un rôle important de ce processus dans le développement et la fonction du système immunitaire adaptatif (Sumpter et Levine, 2010).

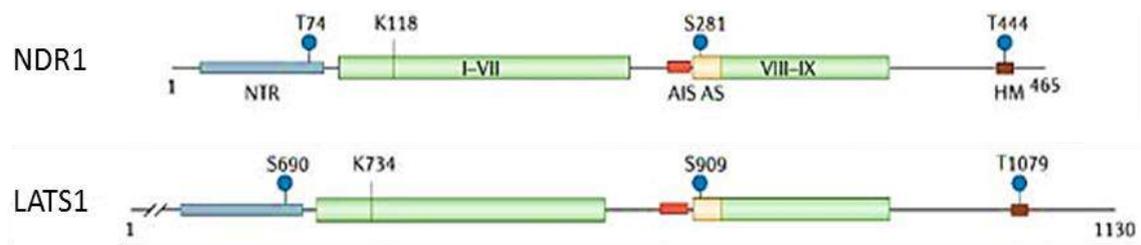


Figure 38: Structure des kinases NDR.

Les kinases NDR partagent toutes deux des caractéristiques uniques : un domaine de régulation N-terminal (NTR), conservé avec un site de phosphorylation, à proximité du domaine catalytique et une insertion entre les sous-domaines I-VII et VIII-IX du domaine catalytique (séparés l'un de l'autre par plusieurs acides aminés basiques inhibant l'auto-activation de la kinase). Ces deux domaines uniques jouent un rôle dans la régulation des NDR, le NTR étant nécessaire pour la liaison du co-activateur (Mob), régulant positivement (Mob1) ou négativement (Mob2) ces kinases. Les deux domaines kinasiques I-VII et VIII-IX sont séparés par une séquence auto-inhibitrice (AIS) et un segment d'activation (AS) où se trouve un site de phosphorylation. En partie C-terminale, se situe un motif hydrophobe (HM) contenant un site de phosphorylation. Chaque kinase NDR possède des sites de phosphorylation qui lui sont propres (d'après Hergovich *et al.*, 2006).

➤ **La protéine WW45 (Sav1)**

Cette protéine adaptatrice associée aux kinases MST, possède un domaine SARAH sur la partie C-terminale et 2 domaines WW lui valant son nom : WW45.

Cette protéine a été initialement identifiée comme un partenaire de la kinase MST1, favorisant l'apoptose passant par celle-ci (Luo *et al.*, 2009). Toutefois WW45 est également requise pour la stabilisation de MST1/2, et forme un complexe avec ces dernières et les kinases LATS1/2, cet ensemble s'autorégule par phosphorylation (Graves *et al.*, 1998).

III.B.2.b. Les kinases NDR et leur protéine Adaptatrice

➤ **Les kinases NDR**

Les kinases NDR sont constituées de 4 membres, les kinases **LATS1** et **LATS2** et les kinases **NDR1** et **NDR2** (nommées aussi STK38 et STK38L). Ces NDR appartiennent à la sous-classe des sérine/thréonine kinases AGC (Protein kinase A, protein kinase G and protein kinase C) qui sont activées par la phosphorylation d'une sérine (LATS) ou d'une thréonine (NDR) conservée dans une région d'activation C-terminale du domaine catalytique de la kinase.

Les NDR sont composées d'un domaine de liaison à leur adaptateur Mob appelé **NTR** (N-terminal regulatory domain) que les autres kinases AGC ne possèdent pas ; de **2 domaines kinasiques I-VII** et **VIII-IX** séparés par une **séquence auto-inhibitrice** (AIS) et un **segment d'activation** (AS) où se trouve un site de phosphorylation (sérine) ; et un **motif hydrophobe** (HM) en C-terminale contenant un site de phosphorylation (thréonine) (Pearce *et al.*, 2010) (Figure 38).

Les kinases NDR sont régulées/phosphorylées par les kinases MST, bien que d'autres régulateurs en amont puissent également intervenir dans cette régulation.

- **NDR1/2**

Les kinases NDR1/2 possèdent une forte homologie de séquence (87%), qui leurs confèrent de nombreux rôles communs (Stegert *et al.*, 2004). L'activation des kinases NDR1/2 se fait :

- 1) par la phosphorylation de leurs motifs hydrophobes sur la thréonine 444/442 *via* les kinases MST1/2/3,
- 2) par leurs liaisons à Mob1 *via* leur domaine NTR sur la sérine 281/282 dans leur boucle d'activation T-loop, nécessaire pour soutenir l'auto-phosphorylation de NDR1/2, et
- 3) PP2A qui peut déphosphoryler les deux thréonine 444/442 NDR1/2 et ainsi inactiver ces kinases (Hergovich, 2013).

Les kinases NDR1/2, régulent YAP en phosphorylant sa sérine 127 empêchant ainsi sa translocation nucléaire (Zhang *et al.*, 2015). De par les substrats qu'elles peuvent phosphoryler, les kinases NDR1/2 ont aussi été impliquées dans la régulation de la cillio-genèse, la duplication des centrosomes et l'alignement des chromosomes au cours de la mitose, comme la progression G1/S, la cytokinèse et enfin l'apoptose (Chiba *et al.*, 2009, 2013; Cornils *et al.*, 2011; Emoto *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2014; Vichalkovski *et al.*, 2008), et plus récemment l'autophagie (Joffre *et al.*, 2015).

- **LATS1/2**

Les kinases LATS1 et LATS2 possèdent chacune deux principaux sites de régulation, une boucle d'activation située sur la sérine 909 et 841 respectivement, et un site de phosphorylation par les kinases MST sur la thréonine 1079 et 1041 (Chan *et al.*, 2005). La phosphorylation de ces 2 résidus favorise l'activation des cofacteurs YAP et TAZ *via* leur motif PPXY. LATS1/2 peuvent être déphosphorylées, sur ces deux sites, par la phosphatase PP2A.

La principale fonction de ces kinases est de phosphoryler YAP/TAZ sur 4 à 5 résidus sérine (dont les S127 et S381 pour YAP et S89 pour TAZ). Toutefois, YAP/TAZ ne sont pas les seuls substrats des kinases LATS1/2, ces dernières contrôlent également l'homéostasie cellulaire, régulent le cycle cellulaire et la mobilité des cellules *via* la régulation qu'elles exercent sur le cytosquelette d'actine et les microtubules, notamment parce qu'elles régulent la voie LIMK/cofiline (Hirota *et al.*, 2000; Meng *et al.*, 2016; Visser et Yang, 2010).

Les kinases LATS sont impliquées dans des voies suppressives de tumeur et oncogéniques. LATS2 peut se lier à la protéine MDM2, inhibant ainsi son activité E3 ubiquitine ligase pour stabiliser p53, ce qui favorise la transcription de LATS2 (Furth et Aylon, 2017).

➤ La protéine Mob1

La protéine adaptatrice **Mob1**, associée aux kinases LATS et NDR *via* leur domaine NTR, fait partie d'une famille de protéines composée de 4 membres : **Mob1-4**, seule Mob1 peut se lier et activer les kinases NDR.

Chez l'homme, il existe 7 isoformes Mob1 (hMOB1A-B, 2A-C, 3, 4), hMOB1A et hMOB1B partagent 95% d'identité de séquence, (Hergovich, 2011). Mob1 permet ainsi l'activation des kinases NDR en interagissant avec ces dernières. L'efficacité de cette liaison est considérablement augmentée lors de la phosphorylation de Mob1 sur les résidus thréonine 12 et 35 par les kinases MST1/2 (Couzens *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2016; Ni *et al.*, 2015; Praskova *et al.*, 2008). Cette affinité accrue de phospho Mob1 pour les NDR entraîne un changement conformationnel (Hergovich, 2013). La formation des complexes Mob1/NDR et Mob1/LATS entraîne une augmentation de l'autophosphorylation des kinases NDR/LATS sur sa boucle de régulation. L'interaction de hMOB1 avec NDR est également importante pour la phosphorylation des motifs hydrophobes de NDR1/2 par les kinases MST, tandis que la phosphorylation des motifs de LATS1/2 est indépendante de hMob1 (Hergovich, 2012).

La protéine hMob2, joue également un rôle dans la régulation de la signalisation NDR mais n'est pas associée à LATS1/2. hMOB2 entre en compétition avec hMob1 pour se lier au domaine NTR de NDR1/2, cette liaison est inhibitrice de la phosphorylation de NDR, tandis que la liaison à hMob1 est activatrice (Gundogdu et Hergovich, 2016; Kohler et al., 2010).

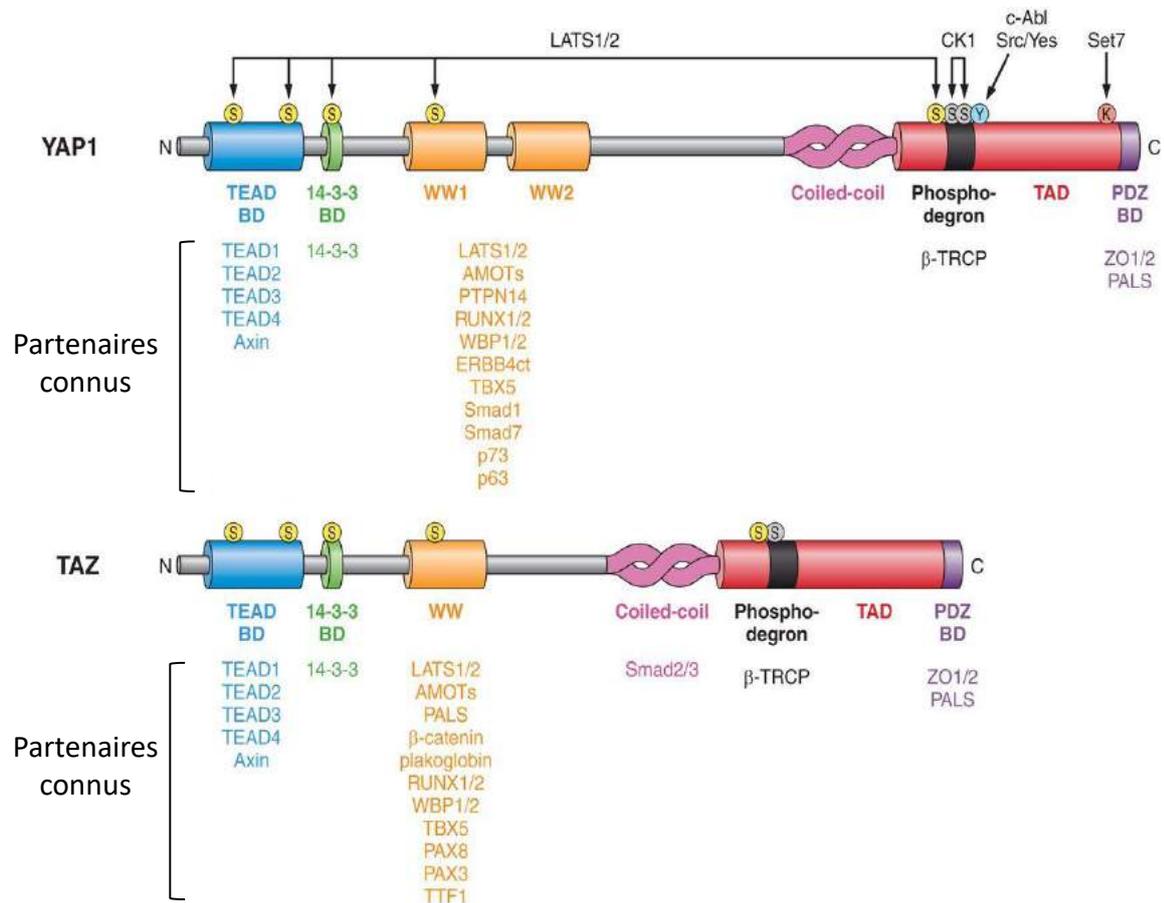


Figure 39 : Domaines protéiques des effecteurs terminaux YAP et TAZ.

Représentation schématique des différents domaines de liaison de YAP/TAZ avec leurs principaux partenaires connus (interactions) pour chaque domaine, leurs sites de phosphorylation ainsi que les kinases catalysant ces modifications (d'après Piccolo *et al.*, 2014).

III.B.3. Les effecteurs terminaux : YAP et TAZ

III.B.3.a. Description générale

Les protéines YAP et TAZ, homologues à 46% sont issues de la transcription de deux gènes distincts : *YAPI* (11q22) et *WWTR1* (3q25) qui seraient issus d'une duplication du gène *YAPI* au moment d'une duplication du génome au cours de l'évolution (Hilman et Gat, 2011). Ces deux cofacteurs transcriptionnels, ne possèdent pas de domaines de liaison à l'ADN, mais ont plusieurs domaines en commun leur permettant d'interagir avec plus d'une vingtaine de partenaires (Figure 39) :

- un **domaine d'interaction** aux facteurs de transcription de **la famille TEAD** (Transcriptional enhancer factor TEF-1) situé en N-terminal, qui donne le rôle d'activateur transcriptionnel de YAP et TAZ.
- un domaine de liaison à la protéine 14.3.3.
- un ou deux **domaines d'interaction de type WW** selon l'isoforme, ces domaines WW sont constitués de résidus tryptophanes permettant l'interaction de nombreuses protéines avec un motif PPxY (notamment LATS1/2 et Kibra).
- un domaine coiled-coil
- un **domaine TAD** (transactivateur), modulant l'activité transcriptionnelle de ses partenaires, au sein duquel se trouve la région ciblée par le complexe β -TRCP/SCF E3 ubiquitine ligase, qui induit la dégradation de YAP phosphorylé sur sa serine 381.
- le domaine d'interaction (motif PDZ) permettant à YAP et TAZ de s'ancrer à toutes les protéines possédant le même motif PDZ (Hong et Guan, 2012).
- un domaine riche en proline en partie N-terminale et un motif SH3 présent sur YAP mais absent de TAZ.

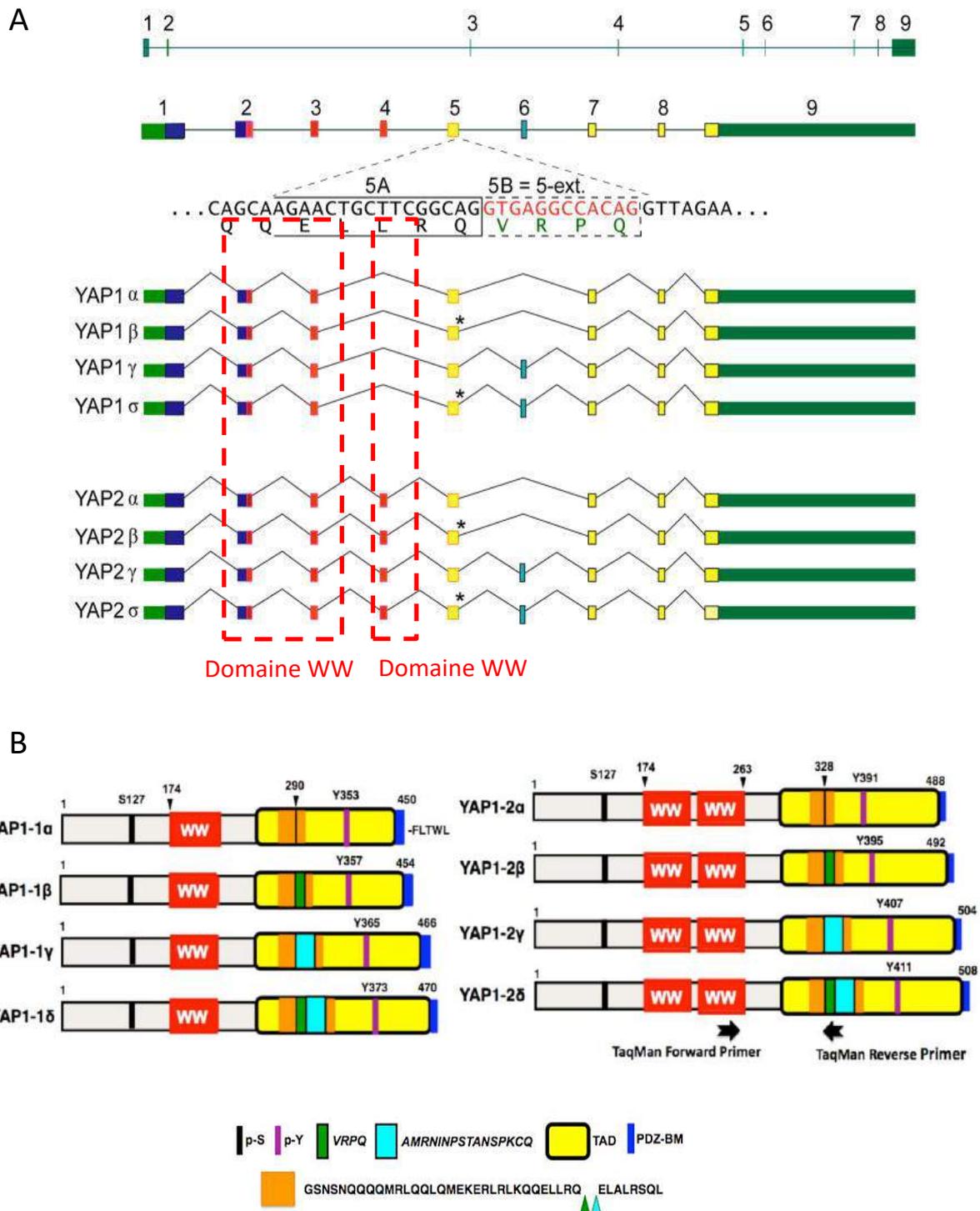


Figure 40 : Représentation schématique des variants (A) et isoformes (B) de YAP1-1 et YAP1-2.

Le gène *YAP1* comprend 9 exons. Le premier domaine WW est codé par les exons 2 et 3. Le second domaine WW, parfois épissé, est codé par l'exon 4; il permet de distinguer les deux familles d'isoformes de *YAP1*: YAP1-1 et YAP1-2 (d'après Gaffney *et al.*, 2012).

Le gène *YAP1* génère 8 variants (de YAP1-1 α à YAP1-1 δ et YAP1-2 α à YAP1-2 δ) séparés en 2 groupes YAP1-1 et YAP1-2 (les 4 isoformes YAP-1 présentent un seul domaine WW et les 4 isoformes YAP1-2 en possèdent deux) (Gaffney *et al.*, 2012) (Figure 40).

Les protéines issues de l'épissage alternatif du gène *YAP1* sont constituées de 450 AA (YAP1-1 α) à 508 AA (YAP1-2 δ).

En l'absence d'études s'étant intéressées aux différences fonctionnelles induites par ces différentes isoformes de YAP1, nous ne connaissons rien du rôle spécifique de chacune de ces isoformes.

Le gène *WWTR1* qui code la protéine TAZ (400 AA) est quant à lui constitué de 7 exons. A l'heure actuelle, aucun travail n'est publié sur l'existence d'isoformes de TAZ chez l'homme.

III.B.3.b. Les régulations de l'activité et la localisation subcellulaire de YAP/TAZ

1) Voie canonique

Les effecteurs terminaux YAP/TAZ sont principalement régulés par la voie de signalisation Hippo. L'inhibition de YAP/TAZ par phosphorylation de leurs résidus sérine (5 pour YAP et 4 pour TAZ), catalysée par les kinases NDR, traduit l'activation de la voie Hippo.

La phosphorylation de YAP/TAZ sur la sérine 127 par LATS1/2 entraîne leur séquestration cytoplasmique (Ser127/89) ou la dégradation par le protéasome (Ser381/311) après interaction des effecteurs avec la kinase CK1 δ/ϵ (Casein kinase 1) conduisant au recrutement du complexe SCF ^{β -TCRP} E3 ubiquitin ligase (Liu *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010).

Les kinases NDR1/2 tout comme LATS1/2 sont également capables de phosphoryler YAP sur sa sérine 127 (Zhang *et al.*, 2015).

Nous verrons plus loin que les kinases NDR ne sont pas les seules à contrôler la distribution subcellulaire de YAP/TAZ. En effet, la seule phosphorylation de YAP en S127 ne suffit pas forcément à une séquestration complète de YAP dans le cytoplasme puisque malgré cette phosphorylation YAP peut être nucléaire (Wada *et al.*, 2011), cette observation a d'ailleurs été reproduite par notre groupe en IF et par des expériences de fractionnement subcellulaires (Dubois F, Keller M *et al.*, unpublished data).

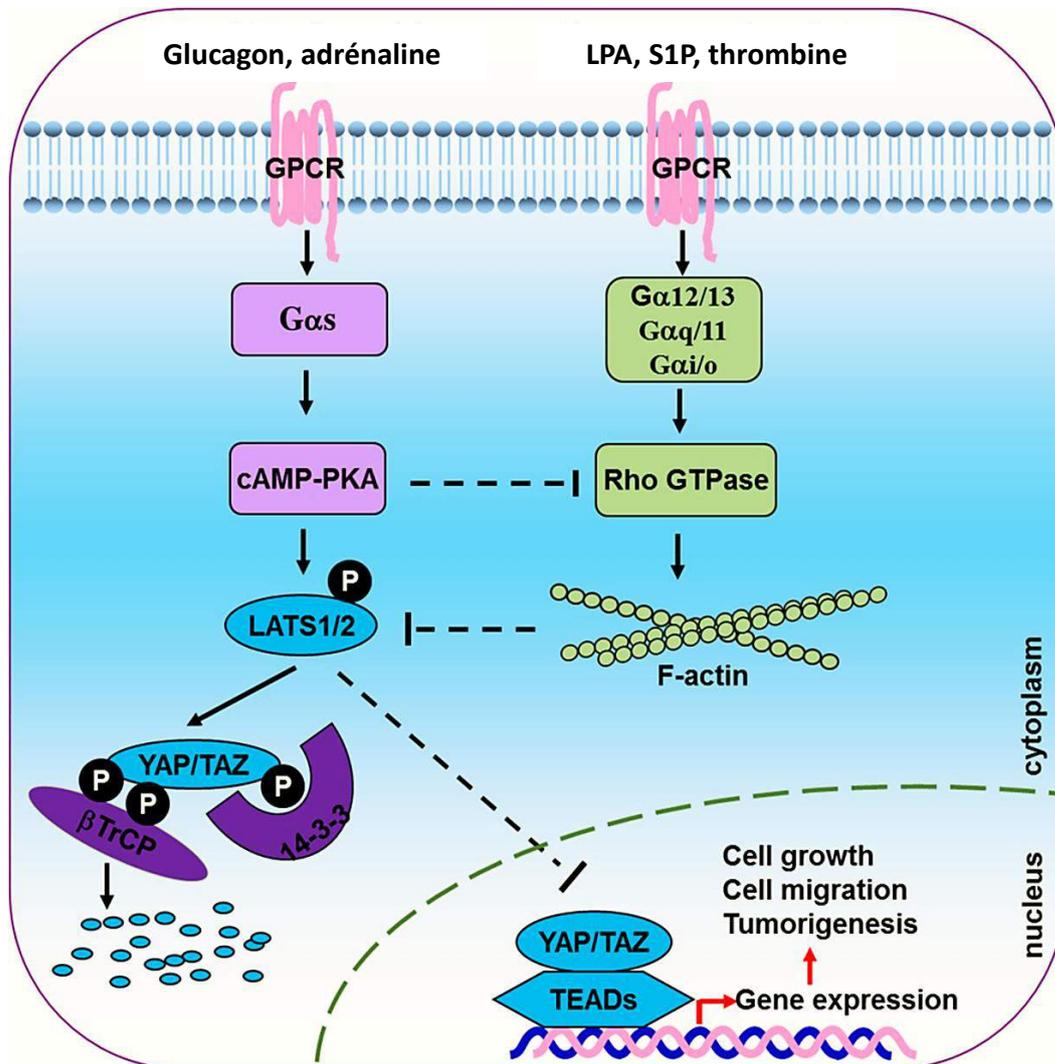


Figure 41 : Régulation de la voie Hippo-YAP/TAZ par les GPCRs via la signalisation Rho GTPase et AMPc-PKA.

Lors de la stimulation de la sous unité $G\alpha_s$ du GPCR, l'activation de la PKA par l'AMPc entraîne l'inhibition des GTPases Rho, qui inhibent indirectement l'activité des kinases LATS via les filaments d'actine. Les kinases LATS1/2 sont alors activées via l'AMPc-PKA, ce qui entraîne l'inhibition de YAP/TAZ par séquestration dans le cytoplasme.

En revanche, la stimulation des sous unités $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_{q/11}$ ou $G\alpha_{i/o}$ par leurs ligands, antagonise l'effet de l'AMPc ou de la PKA sur la phosphorylation de YAP en activant les GTPases Rho et l'assemblage du cytosquelette (d'après Zhou *et al.*, 2015).

2) Voie **non canonique** :

Comme évoqué plus haut, la localisation subcellulaire de YAP/TAZ ne dépend pas que des kinases Hippo, il existe en effet une régulation non-canonique de l'activité de ces effecteurs. La régulation de la distribution subcellulaire de YAP/TAZ exercée par les kinases NDR, peut être influencée par des régulateurs qui agissent en amont de cette voie mais aussi par la signalisation cellulaire induite par les GPCR comme la voie APMc/PKA et les protéines Rho (Yu *et al.*, 2012).

L'activité de YAP/TAZ peut être modulée positivement ou négativement par une large gamme de signaux extracellulaires traduits par les GPCR *via* (Figure 41):

- la stimulation **des protéines Rho GTPases** par les sous unités $G\alpha_{12/13}$, $G\alpha_q/11$, ou $G\alpha_i/o$ activées et stabilisées par LPA (Lysophatidic acid) ou S1P (Sphingosine1-phosphatase). Les Rho agissent sur le cytosquelette d'actine en modulant la voie LIMK/Cofiline (polymérisation de l'actine) entraînant l'inhibition de l'activité des kinases LATS1/2 et par conséquent la translocation nucléaire de YAP/TAZ (Aragona *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2015b).
- L'activation de **la voie AMPc/PKA** par la sous unité $G\alpha_s$ stimulées par le glucagon ou l'épinephrine, active les kinases LATS1/2 (en inhibant les Rho GTPases et en favorisant la phosphorylation des LATS) et inhibe YAP et TAZ de façon dépendante de la PKA (Yu *et al.*, 2013).

Il a été démontré que la régulation de YAP par les protéines G est médiée par la famille Rho de GTPases, la dynamique de l'actine et LATS1/2 (Yu *et al.*, 2012) ou la PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase) et la PI3K (Gumbiner et Kim, 2014; Wang *et al.*, 2016c). Un autre niveau de régulation ligand-dépendante de YAP/TAZ est décrit, il s'agit de la coopération de la voie Hippo-Wnt. En l'absence de signalisation Wnt, YAP/TAZ participent à la dégradation de la β -caténine, à l'inverse, la stimulation par les ligands Wnt dissocie le complexe de destruction, favorisant à la fois la transcription génique médiée par YAP/TAZ et la β -caténine (Azzolin *et al.*, 2014).

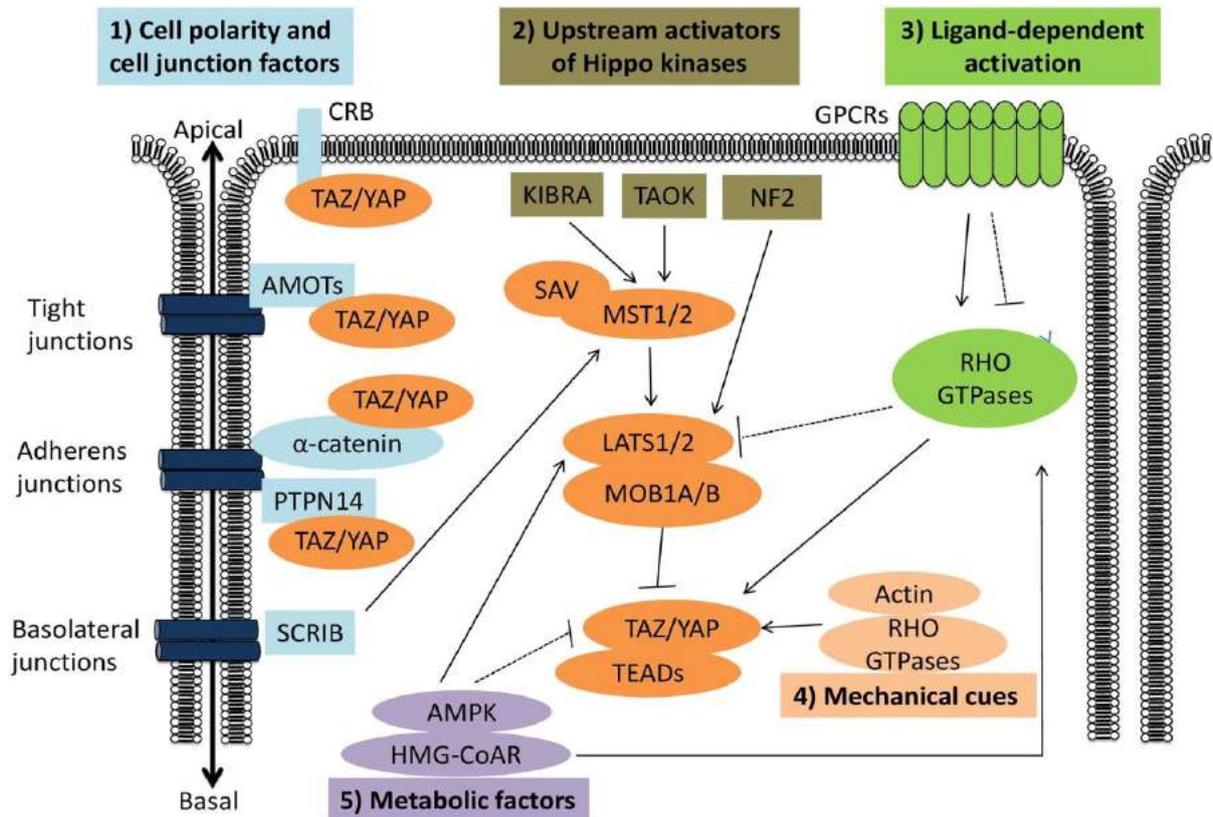


Figure 42 : Régulation directe ou indirecte de YAP/TAZ par les kinases du cœur de la voie Hippo mais aussi par d'autres modulateurs impliquant les acteurs de la polarité et des jonctions cellulaires, les GPCRs, les forces mécaniques ainsi que les facteurs métaboliques: AMPK et HMG-CoA réductase (d'après Maugeri-Saccà et De Maria, 2018) .

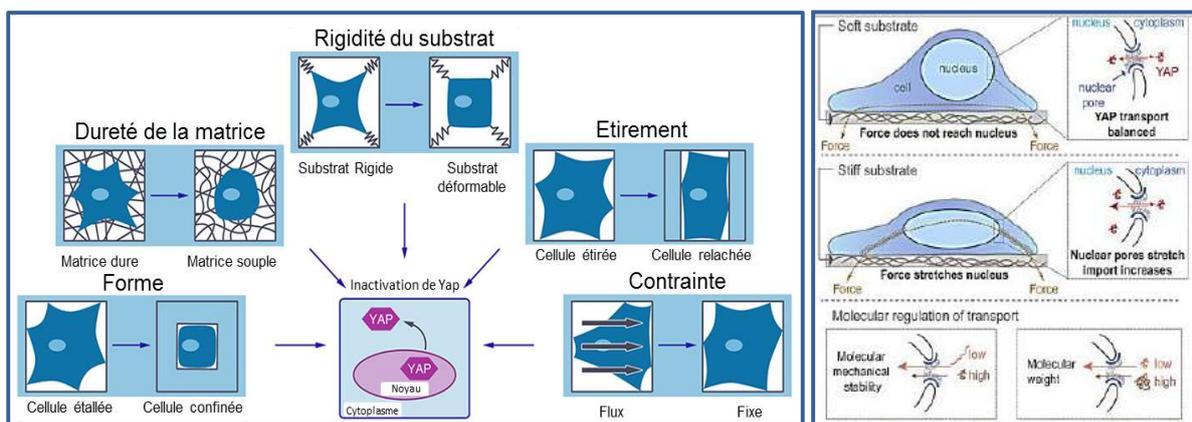


Figure 43 : La localisation de YAP est régulée par l'environnement cellulaire

Différentes forces mécaniques appliquées aux cellules régulent l'activité de YAP. YAP est ainsi localisé dans le noyau et sous forme active dans des conditions où la tension intracellulaire est élevée (soit par une large zone d'adhésion, une MEC solide, des substrats rigides, l'étirement cellulaire ou les contraintes appliquées sur la cellule). A l'inverse, des conditions favorisant de faibles forces contractiles dans la cellule, telles que de petites zones adhésives, des MEC souples, des substrats flexibles, la relaxation des forces d'étirement ou la culture en milieu statique, conduisent à une inactivation de YAP par exclusion nucléaire (d'après Fischer *et al.*, 2016 et Elosegui-Artola *et al.*, 2017).

En plus de la régulation par les GPCRs via les RHO GTPases, YAP et TAZ peuvent être régulés directement ou indirectement par (Figure 42):

- **la polarité cellulaire** et **facteurs de jonction cellule-cellule** qui activent les kinases Hippo ou séquestrent YAP/TAZ,
- **les régulateurs positifs en amont de la voie Hippo**, qui activent MST1/2 ou LATS1/2 (ou encore TAOK, NF2, Kibra, RASSF1A...),
- **des facteurs solubles liant les GPCRs**,
- **les forces mécaniques**, comme la rigidité de la MEC et la densité cellulaire, activent YAP/TAZ via les RHO GTPases et le cytosquelette d'actine indépendamment des kinases Hippo (Aragona *et al.*, 2013; Dupont *et al.*, 2011; Wada *et al.*, 2011),
- **les facteurs métaboliques** induisent la localisation nucléaire de YAP/TAZ, incluant le capteur d'énergie **AMPK** qui inhibe YAP/TAZ à la fois directement et en activant LATS1/2 (DeRan *et al.*, 2014; Mo *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015), et l'**HMG-CoA réductase**, l'enzyme centrale de la voie du mévalonate, qui active YAP/TAZ via la prénylation des GTPases RHO (Sorrentino *et al.*, 2014).

Par ailleurs, la distribution subcellulaire de YAP est aussi déterminée par la force mécanique appliquée aux cellules (Figure 43), modifiant la densité cellulaire, les jonctions cellulaires et les mécanismes moléculaires (Aragona *et al.*, 2013; Dupont *et al.*, 2011), faisant de YAP un régulateur clé de la mécanotransduction (Fischer *et al.*, 2016).

En effet, lorsque les cellules épithéliales sont « pincées/confinées », reposent sur une MEC lâche/souple et lorsque le tapis cellulaire est dense, YAP/TAZ sont présents dans le cytosol. En revanche, lorsque les cellules sont particulièrement étalées/étirées avec une MEC dense et rigide ou que les cellules sont soumises à un étirement et que le tapis cellulaire est clairsemé, YAP/TAZ sont nucléaires (Figure 43).

De plus, deux voies médiées par l'actine pour la régulation de YAP ont été mises en évidence, celle dans laquelle la contractilité d'actomyosine régule la phosphorylation de YAP, et une deuxième qui implique une régulation de l'intégrité du cytosquelette pour la localisation nucléaire de YAP indépendamment de la contractilité (Das *et al.*, 2016)

Récemment, Alberto Elosegui-Artola *et al.*, ont montré que l'entrée de YAP dans le noyau est déterminée par la force mécanique et dévoilent un mécanisme de mécanosensibilisation médiée directement par les pores nucléaires (Elosegui-Artola *et al.*, 2017). L'exposition à un environnement rigide conduit les cellules à établir une connexion mécanique entre le noyau et le cytosquelette, permettant aux forces exercées par les adhérences focales d'atteindre le noyau. La transmission de la force conduit alors à un aplatissement nucléaire, qui étire les pores nucléaires, réduit leur résistance mécanique au transport moléculaire et augmente l'importation nucléaire de YAP. De plus, la restriction au transport est régulée par la stabilité mécanique de la protéine transportée, qui détermine à la fois le transport nucléaire actif de YAP et le transport passif de petites protéines (Elosegui-Artola *et al.*, 2017).

L'attachement des cellules à la MEC induit la localisation nucléaire de YAP par l'activation des Rho-GTPases ou de la voie FAK-Src-PI3K (Kim et Gumbiner, 2015; Zhao *et al.*, 2012). La perturbation de la F-actine bloque l'effet de l'attachement sur la phosphorylation de YAP et la localisation nucléaire. En effet, les interactions MEC-intégrine sont transduites via l'activation d'un double complexe constitué de FAK et du proto-oncogène SRC (c-SRC) (Mitra et Schlaepfer, 2006; Pan, 2015; Zhao et Guan, 2009).

Récemment, deux équipes ont rapporté que l'adhésion cellule-MEC médiée par les intégrines module l'activité YAP dans les cellules épithéliales mammaires humaines par la voie de signalisation RHO GTPases ou FAK-SRC en réponse aux changements de la géométrie cellulaire et la rigidité de la MEC (Kim et Gumbiner, 2015; Tang *et al.*, 2013). La famille RHO GTPases participe au cytosquelette d'actine et à la formation de fibres de stress.

Dupont *et al.*, ont rapporté dans les cellules épithéliales mammaires que la tension du cytosquelette et la réorganisation des fibres de stress induites par la rigidité de la MEC requièrent les GTPases RHO pour réguler l'activité YAP/TAZ et finalement modifier la géométrie et le comportement des cellules (Aragona *et al.*, 2013; Dupont *et al.*, 2011).

Les effecteurs YAP/TAZ sont également régulés par la **phosphorylation d'autres kinases** comme :

- **AKT** qui entraîne la séquestration cytoplasmique et diminue l'apoptose *via* p73 après des dommages à l'ADN (phosphorylation sur Ser127/89 inhibitrice de YAP/TAZ) (Basu *et al.*, 2003).
- **C-Abl** conduit à l'apoptose *via* une augmentation de l'interaction YAP-p73 (transcription gènes pro-apoptotiques) due à la phosphorylation activatrice du résidu

Y357 (Levy *et al.*, 2008). Les phosphorylations par ces deux kinases s'opposent puisque l'une est activatrice et l'autre inhibitrice de l'activité de YAP et TAZ.

- Une phosphorylation activatrice par la kinase **SRC/YES1**, **c-Abl** ou encore **FAK** de YAP peut être apportée sur la tyrosine 357 et favoriser sa localisation nucléaire (Kim et Gumbiner, 2015; Levy *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2016b; Rosenbluh *et al.*, 2012; Taniguchi *et al.*, 2015).
- **HIF-2 α** , potentialise l'activité de YAP1. En 2017 Ma et collaborateurs, montrent que HIF-2 α augmente la croissance des cellules cancéreuses (cancer colorectal) en régulant positivement l'activité de YAP1 (Ma *et al.*, 2017).
- Ces deux paralogues peuvent aussi être phosphorylés par : **JNK1/2** (Tomlinson *et al.*, 2010) ou encore la kinase **CK1 δ/ϵ** et **GSK3** (Glycogen synthase kinase 3) qui induisent la dégradation de YAP/TAZ par le protéasome l'ADN (Huang *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010).

La phosphorylation de YAP et TAZ n'est pas irréversible puisqu'ils peuvent être déphosphorylés par la **phosphatase PP1**. Le complexe PAR3 (YAP), ASPP2 (TAZ) ou encore PP2A, facilite leur déphosphorylation par PP1 (Wang *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016).

Enfin, des **modifications post-traductionnelles** des protéines YAP/TAZ participent également à leur régulation telles que : l'acétylation (Hata *et al.*, 2012), la sumoylation (Lapi *et al.*, 2008) et la méthylation sur la Lysine 494 de YAP (Oudhoff *et al.*, 2013), ainsi que la S-glutathionylation de TAZ (Gandhirajan *et al.*, 2016).

Enfin, YAP et TAZ peuvent aussi s'auto-réguler par un mécanisme requérant TEAD (Moroishi *et al.*, 2015).

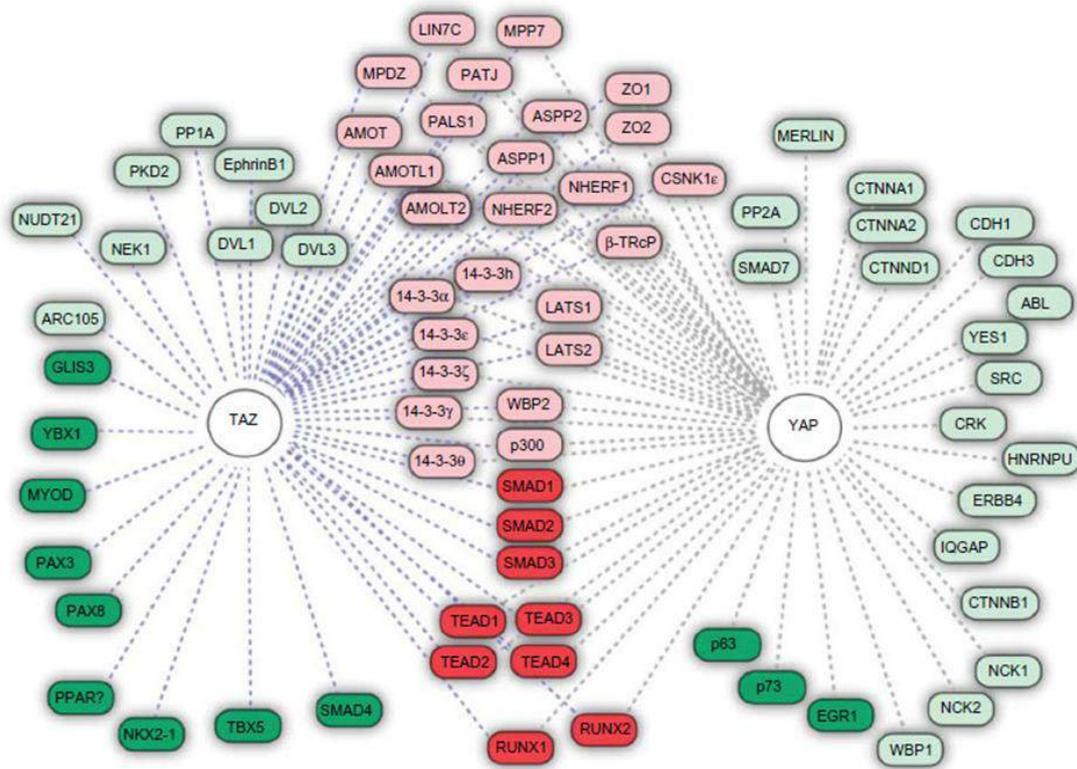


Figure 44 : Interactome de YAP et TAZ.

En rouge les partenaires communs, en vert les partenaires spécifiques. L'intensité de la couleur reflète l'affinité des interactions entre les cofacteurs (d'après Mauviel *et al.*, 2012).

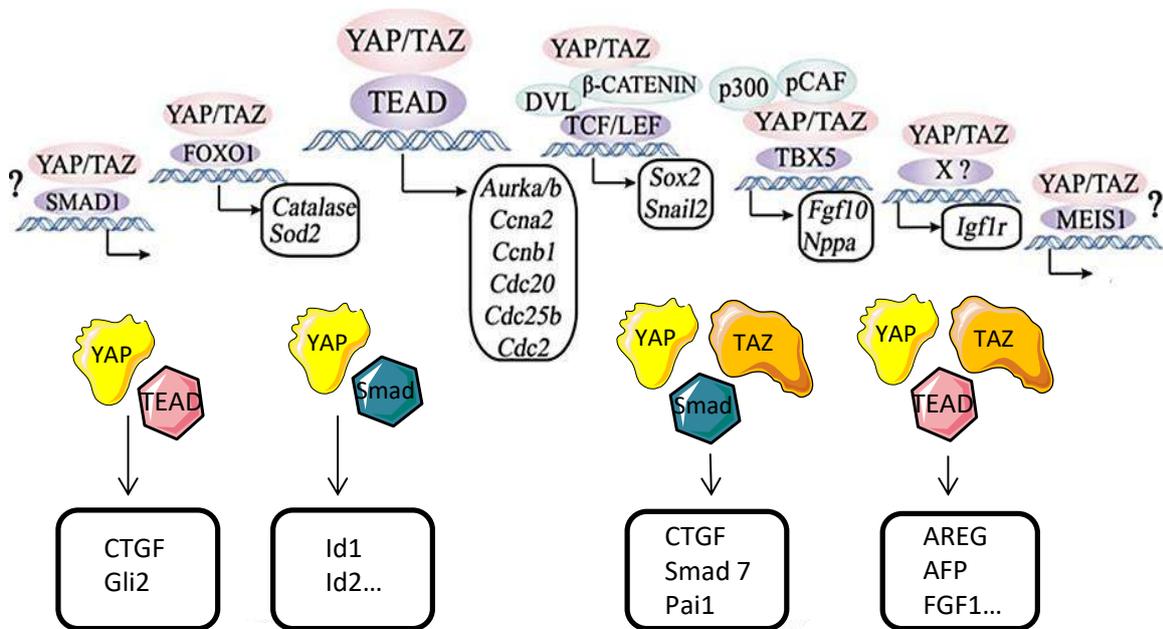


Figure 45 : Interaction de YAP et TAZ avec leurs co-facteurs transcriptionnels et gènes cibles induits (Adapté de Zhao *et al.*, 2012 et Zhou *et al.*, 2015).

III.B.3.c. L'interactome de YAP/TAZ

Parmi les protéines interagissant avec YAP et TAZ, figurent des co-facteurs de transcription interagissant dans le noyau avec YAP/TAZ parfois au sein de complexe moléculaire pour permettre la transcription de nombreux gènes cibles (Figures 44 et 45).

Les principaux **partenaires communs** à YAP/TAZ sont Smad1/2/3, RUNX1/2/3 et les 4 membres de la famille TEAD (Guo et Teng, 2015). Parmi les partenaires propres à YAP figurent notamment p73 (activation des processus apoptotiques pour les cellules avec des dommages sur l'ADN), ErbB4 et ZEB1 qui renforce la transcription des gènes cibles de YAP, TAZ quant à lui interagit spécifiquement avec PAX8, TBX5, PPar- γ ou encore TTF1 (Guo et Teng, 2015; Piccolo *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015a)

Par ailleurs YAP est capable d'interagir avec des protéines mutantes de p53, modulant l'activité transcriptionnelle de ces mutants p53 (cyclin A, cyclin B, and CDK1) ce qui participe sans doute aux propriétés oncogéniques des mutants p53 "gains de fonction" (Di Agostino *et al.*, 2016).

Ainsi, bien que YAP et TAZ soient homologues à 46%, qu'ils soient tous deux régulés par la voie Hippo et se lient à des facteurs de transcription similaires, tels que TEAD, ils peuvent être régulés indépendamment, sont non-redondants et ont des fonctions biologiques différentes en raison de différentes cibles transcriptionnelles dont ils contrôlent l'expression (Kaan *et al.*, 2017) (Figure 45).

III.B.3.d. Les gènes cibles de YAP et TAZ

De nombreux gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires sont sous la dépendance des protéines YAP et TAZ, complexées ou non avec les facteurs de transcription TEAD. Les complexes YAP/TEAD et TAZ/TEAD modulent l'expression de nombreux gènes comme : l'amphiréguline (AREG), CTGF (Connective Tissue Growth Factor) et Cyr61 (protéines matricielles interagissant avec les intégrines et agissant sur la différenciation des fibroblastes du stroma tumoral), le proto-oncogène c-myc, Sox9 (un facteur de transcription essentiel au cours de la différenciation respiratoire au cours de l'embryogénèse), AXL (un RTK impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse), CDK6, des gènes apoptotiques tels que : MCL1, la survivine/BIRC5, c-IAP (Inhibitor of apoptosis protein) ou encore le facteur de transcription FoxO1.

Parmi ces gènes figure donc celui codant l'amphiréguline :

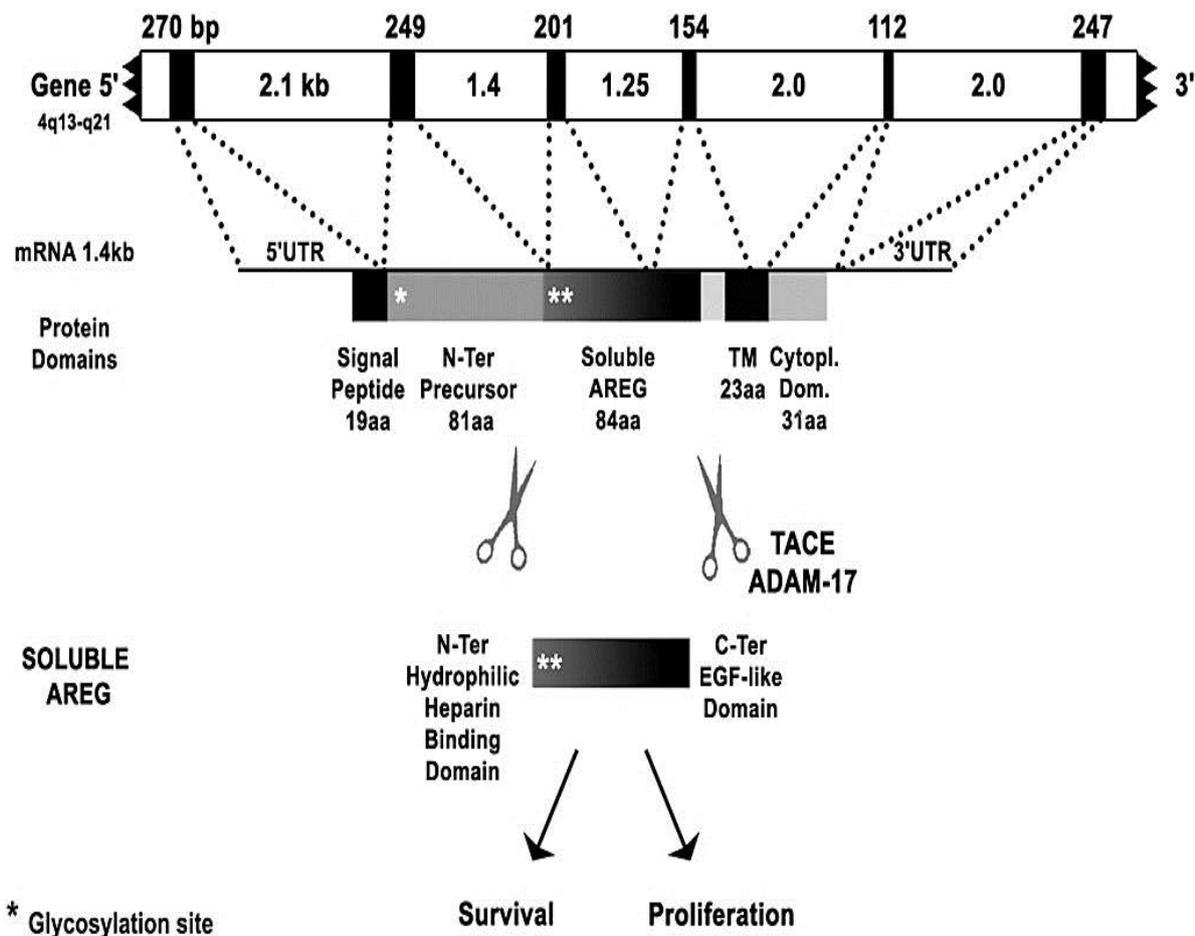


Figure 46: Structure du gène et domaine protéique de l'AREG chez l'homme.

L'AREG est composée d'un peptide signal hydrophobe (AA 1-20), une pro-région hydrophile N-terminale (AA 20-101), un domaine de liaison à l'héparine (AA 102-140), un domaine de type EGF (AA 141-181) avec six cystéines spatialement conservées formant des ponts disulfure et la structure à trois boucles définissant la famille EGF, suivie d'une tige juxtamembrane (AA 182-198) contenant le site de clivage (Lys187) pour « l'ectodomain shedding" (Busser *et al.*, 2011).

III.B.3.d.1. L'amphiréguline, structure

Le gène de l'*AREG* chez l'homme est localisé sur le chromosome 4q13, et se compose de 6 exons (Figure 46). Il code pour une protéine précurseur transmembranaire de 252 AA, appelée pro-AREG (Plowman *et al.*, 1990), qui nécessite un clivage protéolytique (lysine 187) à la surface cellulaire pour libérer le domaine de signalisation actif (Levano et Kenny, 2012).

La pro-AREG contient :

- **un peptide signal hydrophobe,**
- **une pro-région hydrophile N-terminale** avec un site de glycosylation,
- **un domaine de liaison à l'héparine** contenant un autre site de glycosylation et un signal de localisation nucléaire,
- **le domaine de type EGF, suivie d'une tige juxtamembrane (domaine transmembranaire)** contenant le site de clivage (Lys187) pour "l'ectodomain shedding" (Levano and Kenny, 2012),
- **un domaine hydrophobe** (AA 199-221) traversant la membrane cellulaire et
- en C-terminal **un domaine cytoplasmique** avec un autre signal de localisation nucléaire et un site d'ubiquitination à Lys240 impliqué dans l'endocytose de l'*AREG* (Fukuda *et al.*, 2012), se trouve dans la partie intracellulaire de la molécule pro-AREG.

Le clivage de la pro-AREG est réalisé par les protéases de surface cellulaire de la famille ADAM (alfa Disintegrin and Metalloproteinase) : l'ADAM10 ou l'ADAM17 (appelées aussi TACE (tumor-necrosis factor-alpha converting enzyme)) (Duffy *et al.*, 2009).

Ce clivage au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, libère la partie mature de la protéine : les formes solubles de l'*AREG* de 78 à 84 AA. Le domaine N-terminale est extrêmement hydrophile (nombre élevé de résidus de lysine, d'arginine et d'asparagine) et contient un domaine de liaison à l'héparine N-glycosylée. La moitié C-terminale de l'*AREG* (résidus 46 à 84) présente une homologie avec la famille des protéines EGF (Shoyab *et al.*, 1989) et contient six cystéines spatialement conservées formant des ponts disulfure et la structure à trois boucles.

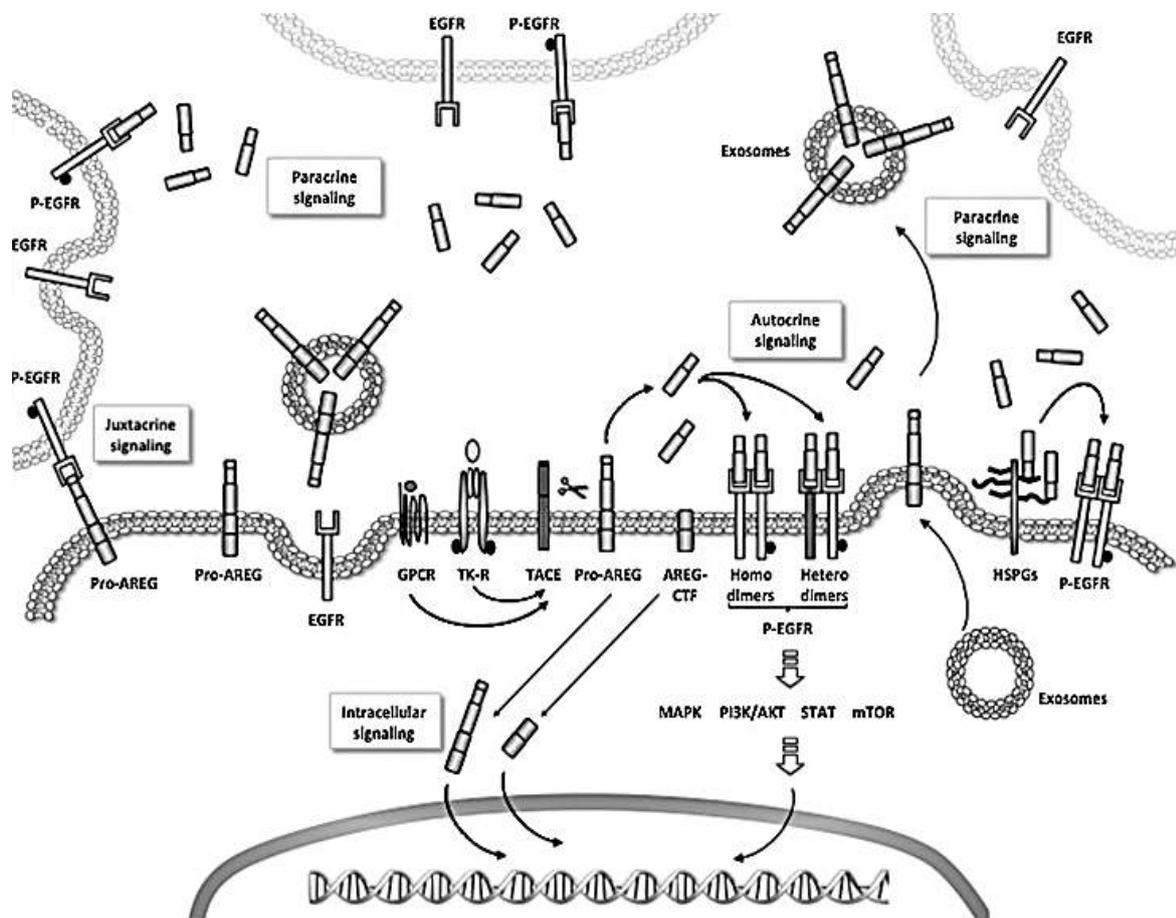


Figure 47 : Représentation schématique des différents modes de signalisation cellulaire de l'AREG.

Le Pro-AREG (lié à la membrane) peut interagir avec l'EGFR par signalisation juxtacrine ou *via* les exosomes. Ce pro-AREG peut aussi être clivé par TACE à la surface des cellules, lui-même stimulé par les ligands des GPCRs et des RTK, libérant les formes solubles de l'AREG. L'AREG soluble peut alors activer l'EGFR par signalisation autocrine ou paracrine et se lier à la surface cellulaire avec les protéoglycane à héparane sulfate (HSPG). La signalisation intracellulaire déclenchée par l'AREG est principalement véhiculée par l'activation des voies de signalisation intracellulaire par l'EGFR (MAPK, PI3K/AKT, STAT, mTOR). L'internalisation et la translocation nucléaire de Pro-AREG, et du fragment AREG-cytosolique (AREG-CTF) généré après le traitement de TACE, peuvent également participer à la signalisation intracellulaire (Berasain et Avila, 2014).

III.B.3.d.2. Régulation de l'amphiréguline

La disponibilité de l'AREG peut être régulée :

- **Au niveau transcriptionnel** par la liaison de répresseurs (BRCA1 lie et réprime la transcription AREG dans des cellules mammaires (Lamber *et al.*, 2010) ou d'activateurs (tels que YAP/TEAD ou encore p53).

Il a été rapporté que l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules de carcinomes mammaires est induite par l'activation de l'AREG de manière YAP dépendant (Zhang *et al.*, 2009b).

De plus, *via* le contrôle transcriptionnel de l'AREG, le complexe TAZ/TEAD favorise la TEM, et la motilité des cellules de carcinomes mammaires ainsi que des cellules rénales embryonnaires (Yang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009a).

- **Au niveau post-transcriptionnel** par la modulation de la stabilité de l'ARNm.
- **Au niveau post-traductionnel** par des modifications covalentes et la régulation du « shedding » de l'AREG.

L'action de TACE sur la Pro-AREG peut être stimulée par l'activation du TCR (T cell receptor), des RTK et GPCRs (Rodland *et al.*, 2008). Elle mène à la sécrétion d'AREG soluble, qui peut alors se fixer à l'EGFR et/ou interagir avec les proteoglycanes à héparane sulfate (HSPG) (Figure 47).

La libération de l'AREG peut également être induite par les cannabinoïdes, certaines cytokines (l'IL-8, TGF- β , TNF- α ou l'IL-1 β), le rayonnement UV ou des médicaments chimiothérapeutiques (Berasain et Avila, 2014).

En réponse à des stimuli du clivage de l'ectodomaine, le fragment cytosolique de l'AREG (AREG-CTF) et la Pro-AREG sont internalisés, le Pro-AREG est adressé à la membrane du noyau en association avec la lamine de type A (Isokane *et al.*, 2008).

L'AREG nucléaire induit des dommages de l'ADN *via* p53 (Taira *et al.*, 2014).

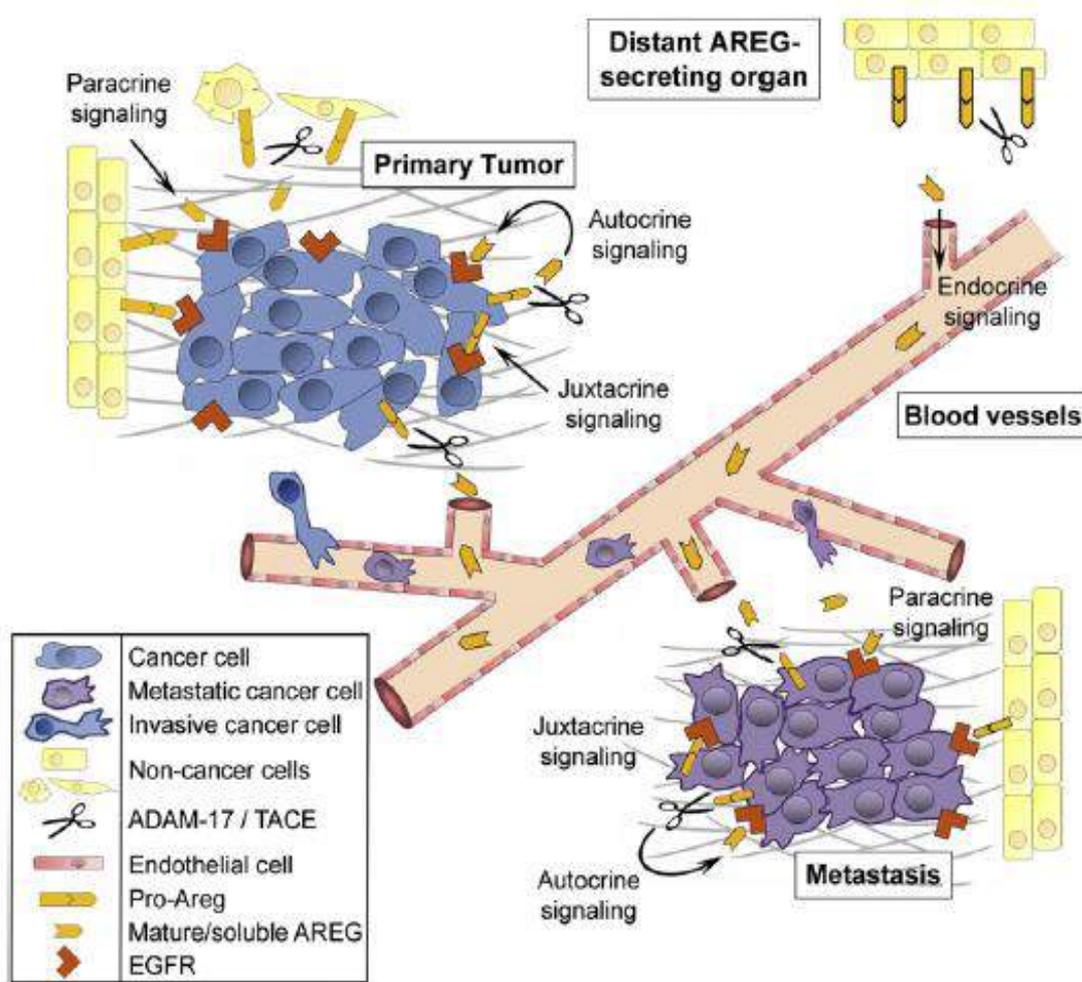


Figure 48 : La signalisation multicrine de l'AREG.

L'AREG est sécrétée sous forme d'un précurseur membranaire (pro-AREG), clivé par la métalloprotéinase matricielle, TACE (ADAM-17). L'AREG soluble est libérée dans le microenvironnement où elle peut rester dans la MEC ou atteindre la circulation sanguine. L'EGFR est activé par l'AREG dans les cellules cancéreuses tumorales primaires ou métastatiques, comme dans les cellules stromales. Une signalisation juxtacrine est également possible lorsque le pro-AREG à la membrane provenant d'une tumeur ou d'une cellule stromale active directement l'EGFR à partir d'une cellule cancéreuse voisine. De plus, l'AREG peut être sécrétée dans la circulation sanguine par des organes sécréteurs distants. La tumeur bénéficiera de cette AREG circulante grâce à un mécanisme de signalisation endocrinien. Ainsi, une tumeur/métastase peut produire sa propre AREG et/ou utiliser l'AREG à partir d'autres cellules par le biais de stratégies d'activation distinctes, mais pas nécessairement concomitantes (d'après Busser *et al.*, 2011).

L'AREG soluble se fixe et active l'EGFR de façon autocrine (Li *et al.*, 1992), paracrine (Sternlicht *et al.*, 2005) et/ou juxtacrine (Willmarth et Ethier, 2006) et active ainsi des voies de signalisation clés, y compris ERK (Kansra *et al.*, 2004; Stoll *et al.*, 2010) et AKT (Gschwind *et al.*, 2003) (Figure 48). Ces cascades de signalisation modulent l'expression de nombreux gènes et déclenchent de multiples réponses cellulaires telles que la prolifération, la survie, l'invasion, la motilité et l'angiogenèse.

III.B.3.d.3. [Rôles / Fonctions physiologiques de l'amphiréguline](#)

Par son action mitogène, l'AREG joue un rôle central dans plusieurs processus biologiques incluant la formation nerveuse et osseuse (Qin *et al.*, 2005), le développement et maturation des glandes mammaires (formation des canaux lactifères dans le système mammaire (Sternlicht, *et al.* 2005)), ainsi que dans l'embryogenèse, en stimulant la croissance de différents tissus comme la prostate (Torrington *et al.*, 1998), le rein (Sakurai *et al.*, 1997) ou le poumon (Schuger *et al.*, 1996).

Chez l'adulte, l'AREG participe à la réparation tissulaire (Monticelli *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2013). En effet, le stimulus mitogène adressé aux cellules épithéliales au site d'infection est coordonné par l'AREG et l'IGF-1 pour permettre la cicatrisation (Zaiss *et al.*, 2015).

Dans les poumons par exemple, après une lésion, l'AREG favorise la régénération de l'épithélium bronchique (Branzk *et al.*, 2014; Monticelli *et al.*, 2011), et diminue la mortalité de souris infectées (Jamieson *et al.*, 2013).

L'AREG possède également une fonction immunosuppressive : des études récentes démontrent que l'AREG module l'expression des cellules régulatrices T. L'AREG améliore la fonction suppressive des cellules Treg *via* la voie de signalisation EGFR (Zaiss *et al.*, 2013) (Figure 49).

L'AREG favorise la fonction des cellules Treg qui sécrètent des exosomes et ainsi transfèrent des micro-ARN immunosuppresseurs (miARN) des cellules Treg aux cellules T effectrices (Okoye *et al.*, 2014). La source d'AREG qui améliore la fonction des cellules Treg semble dépendre du site et du type de réponse immunitaire.

Dans le contexte des réactions d'hypersensibilité, l'AREG dérivé des basophiles est aussi essentielle pour améliorer la fonction des cellules Treg (Meulenbroeks *et al.*, 2015).

Une étude récente, a permis de déterminer comment la signalisation AREG/EGFR contribue à la régulation des réponses immunitaires, en particulier aux cellules Treg.

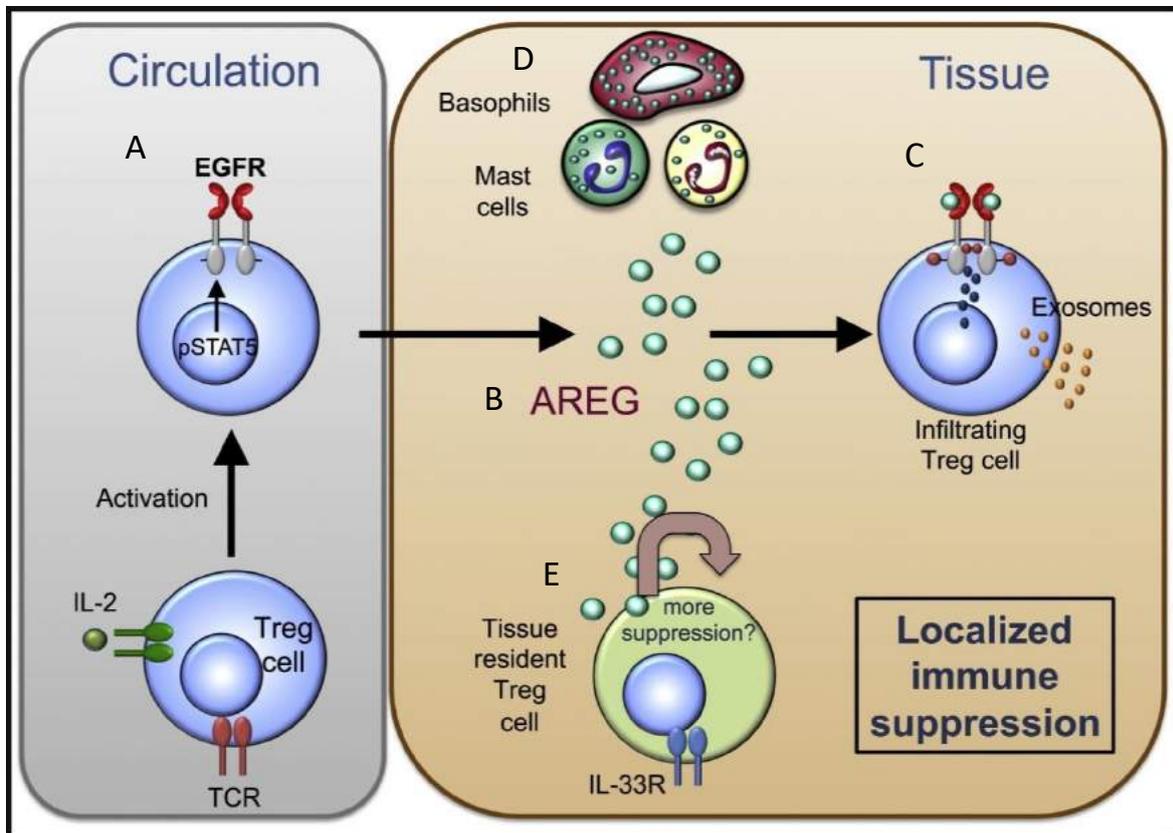


Figure 49 : L'amphiréguline améliore la fonction des cellules T régulatrices (Treg). L'AREG est d'une importance critique pour la fonction cellulaire Treg CD4+, en son absence, les cellules Treg CD4+ ne peuvent pas supprimer l'inflammation locale. Les Treg CD4+ activées, régulent positivement l'EGFR en partie *via* la signalisation médiée par STAT5 (A) puis migrent vers le site de l'inflammation, où ils sont exposés à l'AREG (B), ce qui améliore leur capacité de suppression certainement par la sécrétion d'exosomes immunosuppresseurs (C). Selon le type et le site de l'inflammation, les cellules Treg CD4+ dépendent des différents types cellulaires pour l'AREG. Dans l'inflammation chronique, l'AREG dérivée des mastocytes améliore la fonction des lymphocytes Treg CD4+, alors que dans une réponse inflammatoire aiguë, les basophiles sont décrits comme la principale source d'AREG (D). De plus, certains organes contiennent des Treg CD4+ spécifiques au tissu. En réponse à l'inflammation, ces cellules Treg résidentes dans les tissus peuvent produire de l'AREG qui peut agir de manière autocrine (E) pour améliorer leur capacité de suppression (Zaiss *et al.*, 2013).

Les auteurs rapportent que cette signalisation améliore l'expression de Foxp3 en inhibant la voie GSK-3 β / β -TrCP (Wang *et al.*, 2016d).

Ces différentes études, suggèrent un mécanisme par lequel les cellules mobilisées du système immunitaire inné utilisent l'AREG pour améliorer la capacité de suppression des cellules Treg pour amortir les réponses immunitaires locales et induire une tolérance périphérique (Figure 49). Ces données soulèvent également la possibilité que le microenvironnement de tissu spécifique où l'inflammation est localisée peut déterminer la source d'AREG et influencer sa fonction.

L'AREG est ainsi exprimée physiologiquement mais aussi par les tissus cancéreux.

III.B.3.d.4. AREG et cancers

L'AREG peut dans certains contextes inhiber la croissance de cellules normales ou cancéreuses (Plowman *et al.*, 1990), cependant, l'AREG est principalement décrite comme ayant un rôle oncogénique en faveur de la prolifération. L'activité oncogène de l'AREG a déjà été décrite dans les malignités épithéliales humaines les plus courantes, telles que les poumons, les seins, carcinomes colorectaux, ovariens et de la prostate, ainsi que dans certains cancers hématologiques et mésenchymateux (Busser *et al.*, 2011).

En effet, diverses études ont mis en évidence le rôle fonctionnel de l'AREG dans plusieurs aspects de la tumorigenèse, y compris :

- **l'autosuffisance dans la génération de signaux de croissance,**
- **le potentiel répliatif illimité,** l'AREG soutient l'activité télomérase et favorise une répliation sans limite des cellules (Blasco, 2002; Matsui *et al.*, 2000).
- **l'invasion tissulaire et métastase,** l'AREG peut diminuer les jonctions adhérentes (Chung *et al.*, 2005) et ainsi favoriser la croissance cellulaire indépendante de l'ancrage (Adam *et al.*, 1996). L'AREG peut également augmenter l'expression de l'intégrine alpha-2 (Solic et Davies, 1997), impliquée dans les changements de composition membranaire nécessaires au phénotype invasif des cellules cancéreuses. L'expression de l'AREG dans les tissus cancéreux colorectaux est un marqueur prédictif de la métastase hépatique (Yamada *et al.*, 2008) et du péritoine (Chayangsu et Sriuranpong, 2016) ce qui est compatible avec la capacité de l'AREG à favoriser la migration et l'invasion des multiples cellules tumorales, y compris les cellules cancéreuses du côlon (Higginbotham *et al.*, 2011).

Il a récemment été démontré que les exosomes contenant de l'AREG augmentaient nettement le potentiel invasif des cellules cancéreuses du sein et de l'intestin, indiquant l'existence de mécanismes supplémentaires par lesquels l'AREG peut contribuer au processus métastatique (Ge *et al.*, 2012). Une étude démontre un rôle pro-invasif de l'AREG dans les cellules cancéreuses de l'ovaire (So *et al.*, 2014). Dans d'autres tumeurs malignes, la plupart des effets annonciateurs de l'invasion de l'AREG sont associés à la dégradation de la MEC induite par des protéases. Par exemple, l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène de type urokinase est responsable de l'invasion de l'AREG induite des cellules cancéreuses du sein. De plus, les niveaux et les activités des MMP sont régulés par l'AREG pour favoriser l'invasion de différentes cellules cancéreuses (Liu et Klominek, 2003; Menashi *et al.*, 2003).

- **l'angiogenèse**, indispensable pour l'approvisionnement des tumeurs en oxygène et nutriments, est induite par l'ischémie et les conditions hypoxiques, elles même secondaire à la croissance tumorale. L'AREG induit la sécrétion du VEGF, une cytokine pro-angiogénique (Soh *et al.*, 2007).

- **la résistance à l'apoptose**. L'AREG inhibe l'apoptose des cellules de CBNPC (cancer bronchique non à petite cellules) par une voie IGF1-R- et PKC-dépendante (Hurbin *et al.*, 2002, 2005), qui aboutit à l'inactivation de BAX. L'AREG est également fréquemment relarguée dans le sérum, les tissus et l'épanchement des patients atteints de cancer du poumon et de cancer gastrique, où elle augmente la fonction suppressive des cellules Treg.

- **L'AREG favorise la suppression immunitaire dans le microenvironnement tumoral**. Les microenvironnements de tumeurs solides peuvent avoir des concentrations locales élevées d'AREG. La fonction immunosuppressive de l'AREG favorise la tolérance du système immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales.

➤ [L'augmentation de l'expression d'AREG est corrélée à une faible survie globale dans plusieurs cancers :](#)

L'expression élevée de l'AREG pourrait être un biomarqueur pronostique notamment dans le cancer gastrique (Wang *et al.*, 2016a), les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Gao *et al.*, 2016) ou encore les CBNPC (Fontanini *et al.*, 1998; Ishikawa *et al.*, 2005), puisque significativement associée à une mauvaise survie globale, ainsi qu'à la différenciation, à la progression de la tumeur, y compris le TNM, l'invasion et les métastases. Cette valeur pronostique se retrouve dans les dosages sériques : un taux élevé d'AREG sérique est corrélé à des métastases hépatiques et péritonéales dans le carcinome colorectal (Chayangsu et Sriuranpong, 2016; Li *et al.*, 2010; Yamada *et al.*, 2008).

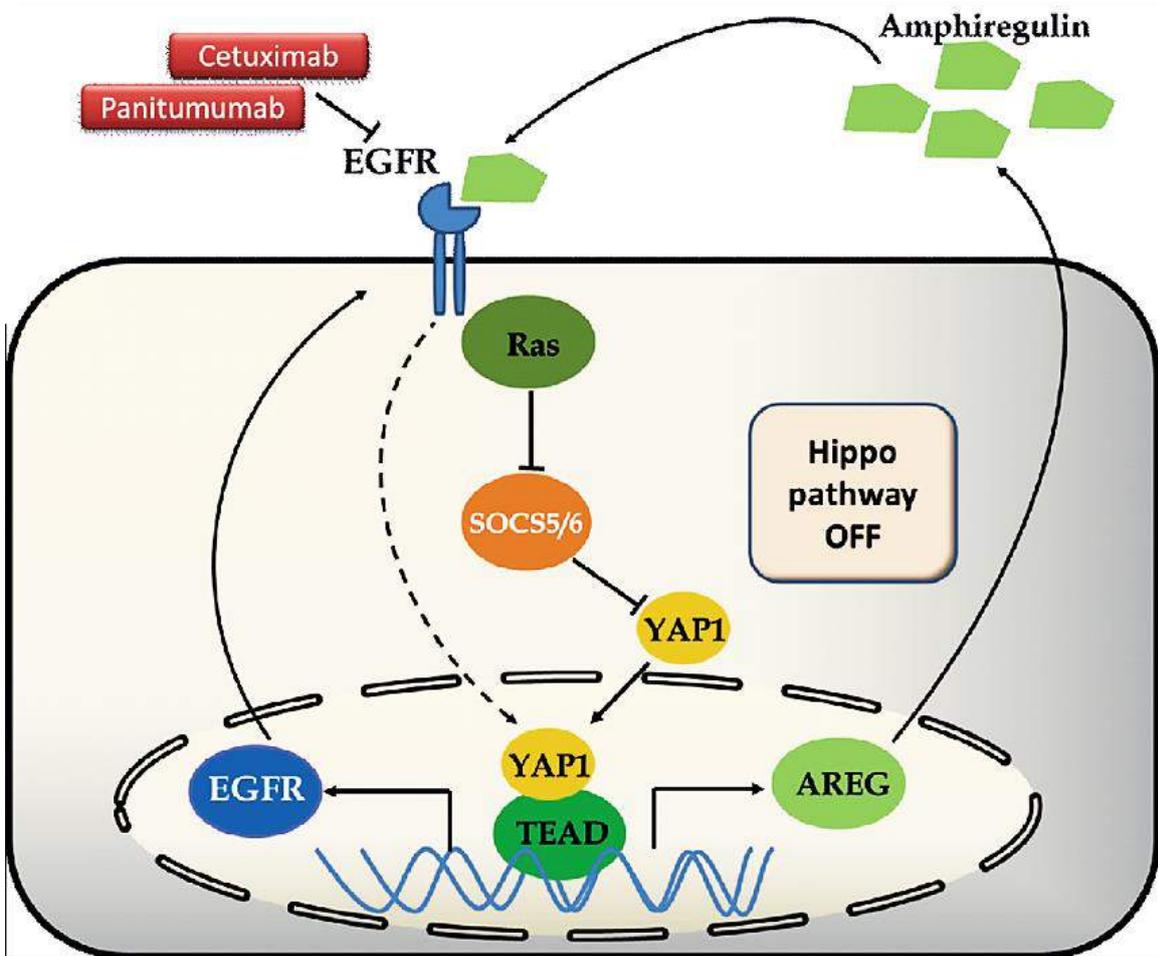


Figure 50 : Relation indirecte entre EGFR/KRAS et YAP.

Une régulation autocrine positive entre l'EGFR et YAP est établie *via* l'expression de l'AREG. Le cetuximab et le panitumumab sont des anticorps monoclonaux humanisés contre l'EGFR utilisés dans la thérapie du cancer colorectal (Wierzbicki *et al.*, 2015).

Toutefois, à l'inverse, certaines études rapportent que l'expression élevée d'AREG est associée à une survie globale et à une survie sans progression plus longue (Jing *et al.*, 2016; Ohchi *et al.*, 2012).

Chang *et al.*, montrent ainsi en 2011, que la survie sans progression est de 8,1 semaines chez les patients AREG-positifs vs. 4 semaines chez les patients AREG-négatifs, et la survie globale était significativement plus longue chez les patients AREG-positifs que chez les patients AREG-négatifs atteints d'un CBNPC EGFR positif (Chang *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent que les patients CBNPC EGFR positifs avec des tumeurs AREG-positives peuvent bénéficier d'un traitement avec les TKI-EGFR, indiquant que l'expression de l'AREG peut être un marqueur potentiel pour le choix du traitement TKI-EGFR chez ces patients.

➤ Résistance aux traitements

L'influence de l'expression de l'AREG sur la réponse des patients atteints de cancer est assez controversée et fait encore débat. En effet, dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, la sécrétion d'AREG est corrélée positivement avec la sensibilité au Gefitinib (Rogers *et al.*, 2009) tandis que dans le cancer bronchique, l'AREG est associée à une survie plus courte des patients traités par Gefitinib (Busser *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2005) ou à l'inverse, associée à une sensibilité au Gefitinib par d'autres (Yonesaka *et al.*, 2008). De plus, des taux accrus d'AREG sérique ont été corrélés à une faible réponse au Gefitinib chez les patients atteints d'un CBNPC avancé (Ishikawa *et al.*, 2005; Masago *et al.*, 2008). Chez les patients atteints d'un cancer colorectal, l'augmentation de l'expression de l'ARNm prédit l'efficacité du Cetuximab (Jacobs *et al.*, 2009; Khambata-Ford *et al.*, 2007) mais la non réponse aux inhibiteurs à l'EGFR (Hobor *et al.*, 2014). Enfin, l'AREG semble aussi parfois impliquée dans la non réponse aux agents de chimiothérapie conventionnelle comme le cisplatine dans le cancer du sein et le foie (Chang *et al.*, 2009; Eckstein *et al.*, 2008).

Ces divergences peuvent s'expliquer par les méthodes hétérogènes qui ont été utilisées pour détecter l'expression de l'AREG, les différents types de cancers et les différences dans la distribution subcellulaire de l'AREG entre les tumeurs locales et les taux d'AREG présents dans la circulation systémique.

Néanmoins, une boucle de rétroaction positive a récemment été découverte entre l'activation de YAP et l'augmentation de la signalisation EGFR/KRAS retrouvée dans le cancer de l'œsophage, de l'ovaire, hépatocellulaire ou encore le cancer colorectal, ce lien pourrait expliquer la résistance aux inhibiteurs de l'EGFR (Hong *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015; Wierzbicki et Rybarczyk, 2015) (Figure 50).

III.C. Implication de l'altération de la voie Hippo dans l'histoire naturelle du MPM

La plupart des membres de cette voie de signalisation jouent un rôle de suppresseur de tumeur, et sont inactivés dans de nombreux cancers avec pour conséquence une forte expression et activité de YAP/TAZ, seuls oncogènes de la voie Hippo, activité en générale de mauvais pronostic sur la survie des patients, YAP/TAZ favorisant la prolifération cellulaire et l'apparition de métastases.

Dans le MPM, l'inactivation de la voie Hippo peut être consécutive de l'inactivation directe de ses membres : il est rapporté des mutations par **délétion homozygote** de LATS2 décrites comme touchant 8 à 12% des cas de MPM (Bott *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2011; Tranchant *et al.*, 2017). Des mutations de NF2 sont fréquentes puisqu'elles sont retrouvées chez 14 à 19% des cas de MPM (Bueno *et al.*, 2016; Lo Iacono *et al.*, 2015; De Rienzo *et al.*, 2016) tandis que l'hyperméthylation du promoteur de RASSF1A, déjà évoquée précédemment, survient dans 20 à 32% des MPM (Destro *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2012). Cependant, l'inactivation de la kinase MST1 n'a pas encore été établit dans le MPM.

Toutes ces altérations de la voie Hippo et de ses régulateurs laissent penser que cette voie est fréquemment inactivée dans le MPM et que YAP/TAZ pourraient être des acteurs majeurs de la carcinogenèse pleurale. En accord avec cette hypothèse, récemment, il a été démontré dans le MPM que YAP est activé de façon constitutive chez 59 à 70% des patients testés (Meerang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

Comme évoqué plus haut, parmi les gènes régulés par YAP/TAZ, figure le gène de l'AREG. Très peu d'études se sont intéressées au rôle de l'AREG dans le MPM, pourtant les quelques travaux de la littérature ayant abordé cette question suggèrent que l'AREG puisse jouer un rôle dans la carcinogenèse pleurale. En effet, il est établi que les MMPs produites par les cellules tumorales et stromales jouent un rôle clé dans l'invasion des cellules tumorales et les métastases. Or, en 2003, Liu et Klominek ont montré que les facteurs de croissance, y compris l'AREG, régulent la sécrétion de MMP-9 et/ou MMP-3 dans une lignée cellulaire de mésothéliome (Liu et Klominek, 2003).

Une seconde étude menée par les mêmes auteurs, démontre que l'AREG stimule également la migration des cellules de mésothéliome malin alors que cet effet n'est pas retrouvé dans les cellules mésothéliales saines (Liu et Klominek, 2004).

En accord avec ce rôle possible de l'AREG dans la carcinogénèse pleurale, Cesarion *et al*, rapportent que les cellules de MPM surexpriment l'AREG ainsi que l'EGFR, l'EGF et le TGF- α , ce qui suggèrent qu'une activation excessive de l'EGFR peut contribuer à l'agressivité du mésothéliome (Cesario *et al.*, 2005).

IV. Objectifs de la thèse :

Le mésothéliome pleural malin (MPM) est donc une tumeur primitive rare affectant les cellules épithéliales de la plèvre, de pronostic très sombre. Bien que quelques anomalies récurrentes du MPM soient aujourd'hui rapportées dans la littérature, l'histoire naturelle de ce cancer est encore peu comprise, cette tumeur rare ayant pu faire l'objet de peu d'études.

Le volet biologique de l'essai MAPS, qui vise à caractériser les anomalies moléculaires des prélèvements de 448 patients atteints de MPM, est donc une occasion unique de pouvoir améliorer ces connaissances de la maladie et d'identifier des marqueurs pronostiques et/ou prédictifs de la survie des patients. Parmi les quelques anomalies reconnues du MPM figurent les altérations de NF2 et LATS2, soit de la voie Hippo, voie régulée par les membres de la superfamille RASSF.

Cette thèse avait donc pour objectifs :

- 1) **Identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques du MPM** en caractérisant les anomalies moléculaires de la voie de signalisation RASSF/Hippo chez les 448 patients inclus dans l'essai clinique MAPS et en testant l'influence de ces anomalies sur la survie et/ou la progression de ces patients.

- 2) Comprendre **quelles fonctions et signalisations** essentielles à l'homéostasie cellulaire, auxquelles participe la voie de signalisation RASSF/Hippo, **sont perturbées lors du processus de transformation des cellules mésothéliales.**

Matériels et Méthodes

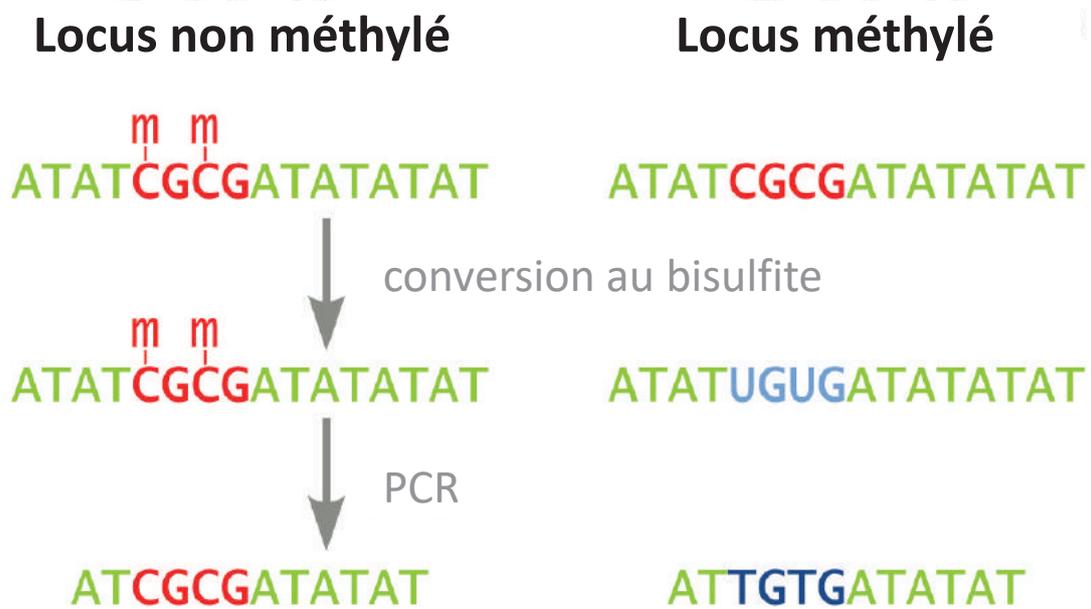


Figure 51 : Représentation schématique du principe de la conversion au bisulfite de sodium par MS-PCR (PCR spécifique de méthylation).

I. Etude Bio-MAPS: Analyse des statuts de méthylation des promoteurs des gènes RASSF/Hippo chez les patients atteints de MPM inclus dans la phase III de l'essai MAPS

I.A. Extraction des ADNs (*Kit QIAGEN FFPE®*)

Après avoir réalisé 10 copeaux de tissus de 5 µm au microtome des blocs de paraffine contenant les tumeurs mésothéliales des patients inclus dans l'essai de phase III MAPS, les ADNs sont extraits selon les recommandations du *Kit QIAGEN FFPE®*. Les copeaux déposés dans un tube eppendorf sont déparaffinés à l'aide de xylène (1 ml). Le mélange est centrifugé (12 000 rpm, 2 min), le surnageant éliminé et le culot est ensuite lavé à l'aide d'éthanol absolu (1 ml). Après une nouvelle centrifugation (12 000 rpm, 2 min), le surnageant est éliminé et le culot séché à l'air libre pour éliminer toutes traces d'éthanol. Les coupes de tissus sont suspendues dans du tampon ATL et incubées à 56° pendant 1h30 en présence de protéinase K afin de digérer les protéines des prélèvements. La protéinase K est inactivée par une nouvelle incubation des prélèvements pendant 1h à 90°. Le lysat est incubé en présence de tampon AL (200µl) et d'éthanol 100% (200 µl) puis vortexé. Le mélange est transféré dans une colonne Qiamp™ possédant une membrane de silice, et elle-même déposée dans un tube collecteur avant d'être centrifugée (6000 rpm, 1 min). La membrane de silice ayant piégé les ADNs est lavée 2 fois avec du tampon AW1 puis AW2 par centrifugation (10 000 rpm, 5 min). Enfin, les ADNs sont élués avec 40 µl de Tampon ATE par centrifugation (10 000 rpm, 4 min). La concentration en ADN est déterminée par mesure de l'incorporation d'une sonde fluorescente (Qubit, Invitrogen®).

I.B. Conversion au Bisulfite de sodium

I.B.1. Principe (Figure 51)

L'hyperméthylation des promoteurs de gènes chez les mammifères, se traduit par la méthylation des Cytosines (C) incluses dans des îlots CpG (régions répétant le motif Cytosine-Guanine), conduisant alors à l'extinction d'expression du gène correspondant. Afin de quantifier ce phénomène, nous utilisons un traitement au bisulfite de sodium convertissant les Cytosines non méthylées en Uraciles (U), reconnues alors par l'ADN-polymérase comme une Thymine (T), ce qui permet ainsi de les distinguer des Cytosines méthylées (non converties en Uracile) et reconnues pour ce qu'elles sont des Cytosines par l'ADN polymérase.

Tableau 6 : Séquences des couples d'amorces utilisées pour la détermination du statut de méthylation des promoteurs de gènes.

Séquence (5'→3')		T _M	Size (bp)	Références	
LATS1 (Genbank access : NW_001838990.2)					
U:	F: TGAATGATTAGAGTTGTGGGTGATGT	60°C	128	Seidel et al., 2007	
	R: AAACATTTCCCAACATCACTTACACA				
M:	F: GAACGATTAGAGTTGCGGGCGAC	62°C	126		
	R: AACATTTCCCGACGTCGCTTACG				
LAST2 (Genbank access : 26524)					
U:	F: GGTGTTTTGTTGGATTGGTATGTGGTT	60 °C	141	Seidel et al., 2007	
	R: CATCTTCCCAAAACACTCACACCACA		137		
M:	F: TTCGTTCCGATTGGTATGCGGTC				137
	R: CCATCTTCCCGAAACGCTCACG				
MST1 (Genbank access : NW_001838666.1)					
U:	F: TTTGTGGGGTGGGTTTAGGAGGTTTGT	63°C	125	Seidel et al., 2007	
	R: AACCAATAACCCCTACCAACACAACAA		120		
M:	F: GCGGGGCGGGTTTAGGAGGTTT				120
	R: CCAATAACCCCTACCGACGC				
MST2 (Genbank access : NT_008046.15)					
U:	F: TTTTAAGTGGGAGGGAGATTTGTTGTGG	61°C	108	Seidel et al., 2007	
	R: AAAAACCAAAACACCAACCAACCAAAACC				
M:	F: CGGGAGGGAGATTCGTCGCG	63°C	99		
	R: AAACCGAAACACCGACCGACCG				
RASSF1A (Genbank access : NC_000003)					
U:	F: TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG	60°C	108	Schagdarsurengin et al., 2002	
	R: CAAACCCACAAACTAAAAACAA				
M:	F: GTGTTAACGCGTTGCGTATC	62°C	96		
	R: AACCCCGCGAACTAAAAACGA				
RASSF2 (Genbank access : NT_011387.8)					
U:	F: AGTTTGTTGTTGTTTTTAGGTGG	63°C	108	Hesson et al., 2005	
	R: AAAAAACCAACAACCCCAACA				
M:	F: GTTCGTCGCTGTTTTTAGGCG				108
	R: AAAAAACCAACGACCCCGCG				
Nore1A/RASSF5 (Genbank access : NC_000001)					
U:	F: ATTTATATTTGTGTAGATGTTGTTGGTAT	63°C	215	Hesson et al., 2004	
	R: ACTTTAACAACAACAACCTTAACAACACTACA				
M:	F: CGTCGTTTGGTACGGATTTATTTTTTTCGGTTC	62°C	202		
	R: GACAACCTTAACAACGACGACTTTAACGACTACG				

U : non méthylé, M : méthylé, T_M : température d'hybridation des amorces, pb: paire de base.

Ainsi, une amplification par PCR au moyen de couples d'amorces reconnaissant spécifiquement la présence ou l'absence de conversion de la base azotée (séquences contenant des T à la place des C de la séquence promotrice normale amplifiée) permet de détecter l'existence d'une méthylation de ces séquences promotrices amplifiées.

I.B.2. Méthode (Kit de Conversion de Bisulfite EPITECT, Qiagen®)

Les différents ADNs (100 ng) sont convertis en les incubant en présence de 85 µl de solution de Bisulfite de sodium, 35µl de « DNA Protect buffer », et 20 µl d'H₂O sans RNase et en effectuant, dans un thermocycleur, une succession de dénaturation à 99°C /incubation à 60°C. Les ADNs convertis sont ensuite transférés dans des colonnes EPITECT puis purifiés : la solution d'ADN est mélangée à du tampon BL et une solution de « RNA Carrier » fraîchement préparée. Les colonnes sont ensuite centrifugées (12 000 rpm, 1 min). L'éluât est éliminé et la colonne remplacée sur un nouveau tube collecteur.

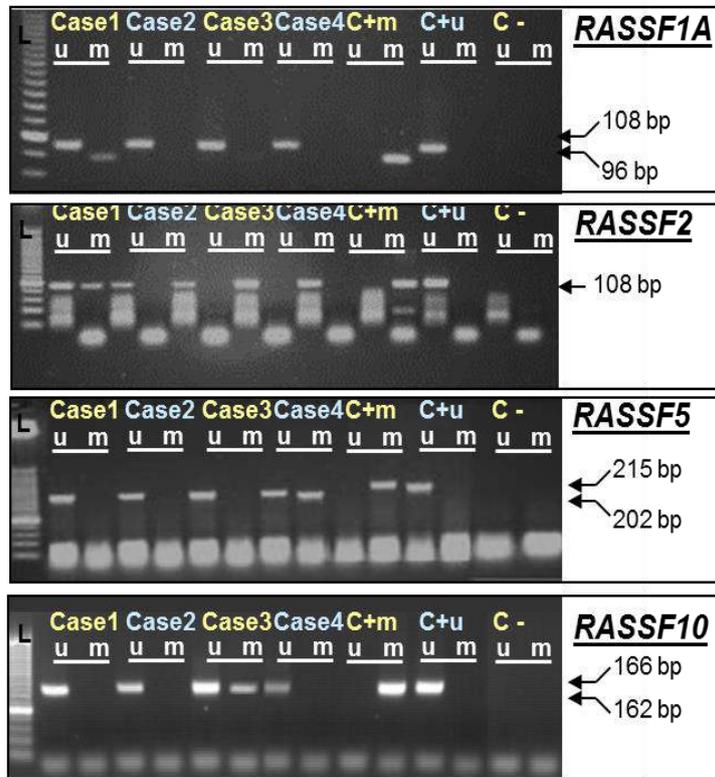
Les ADNs, piégés sur la membrane de silice que contient la colonne EPITECT, sont lavés par 4 lavages successifs avec du tampon BW puis avec le tampon BD par centrifugation (12 000 rpm, 1 min). La solution d'ADN purifiée est éluée avec 30µl de Tampon EB par centrifugation (12 000 rpm, 2 min).

I.C. PCR spécifique de méthylation (MS-PCR)

Les ADNs (8 µl d'ADN convertis) sont amplifiés en présence de 30 µl d'un mélange réactionnel (5 µl Tampon Gold 10X, 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 2 µl dNTP (2,5 mM chacun), 2,5 µl Amorces sens, (20pmol/µl), 2,5 µl Amorces antisens (20pmol/µl) (Tableau 6), 15 µl H₂O, 0,5 µl Taq polymérase (5 UI/ml)). Un contrôle négatif (PCR-) est effectué en remplaçant l'ADN par de l'eau sans nucléase, ainsi que deux contrôles positifs (un contrôle positif d'hyperméthylation de promoteur (ADN méthylé commercial) et un contrôle positif d'absence d'hyperméthylation du promoteur (ADN de lymphocyte de donneur sain)). L'amplification est réalisée selon un programme spécifique en 3 étapes :

1) Activation de l'enzyme Taq (15 minutes à 95°C), 2) Un cycle répété 32 fois comprenant la dénaturation (30 secondes à 94°C), puis l'hybridation (30 secondes à 63°C), et enfin l'élongation (30 secondes à 72°C), 3) et une étape terminale d'élongation (1 minute à 72°C).

MS-PCR



COBRA

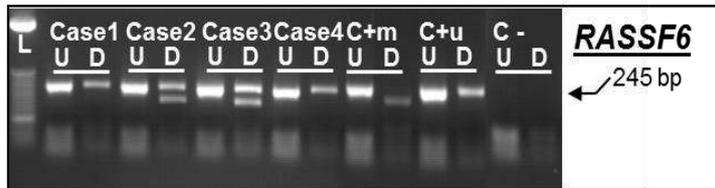


Figure 52: Exemple de visualisation des fragments d'ADNs amplifiés sous UV sur gel d'agarose 2,5% permettant de définir les statuts de méthylations des promoteurs des gènes RASSF.

u : non méthylé, m : méthylé, U : non digéré, D : Digestion par l'enzyme de restriction Taq1, L : Marqueurs de taille (25pb (paire de bases)).

Les fragments d'ADNs amplifiés sont visualisés sous UV sur gel d'agarose 2,5%, contenant 1% d'agent intercalant de l'ADN (GelRed®) après électrophorèse dans un courant électrique continu de 100V pendant environ 30 minutes (Figure 52).

La détermination du statut de méthylation de RASSF6 se fait après extraction des ADNs et conversion au bisulfite de sodium mais en utilisant cette fois ci une technique Cobra. La présence de la méthylation et donc la conversion de la base, introduit le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction Taq1, les fragments amplifiés sont ainsi secondairement incubés en présence de la Taq1 (30 min à 37°C).

Le clivage ou non du fragment est déterminé par visualisation des fragments sur gel d'agarose 2,5% sous UV, contenant 1% d'agent intercalant de l'ADN (GelRed®) après électrophorèse dans un courant électrique continu de 100V pendant environ 30 minutes (Figure 52).



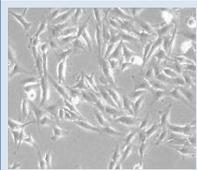
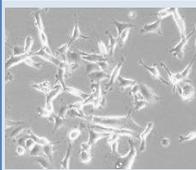
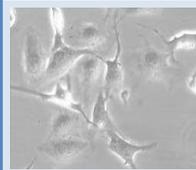
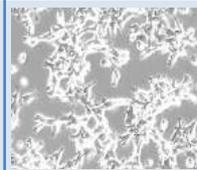
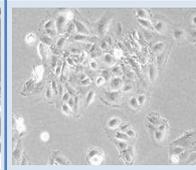
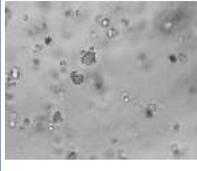
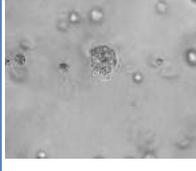
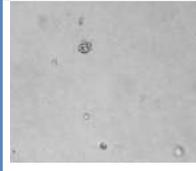
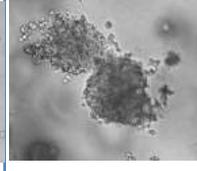
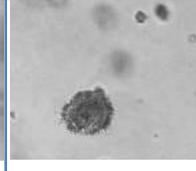
Figure 53 : Séquençage Sanger des promoteurs de gène testés dans l'essai MAPS méthylés (M) ou non (U) alignés sur la séquence sauvage (WT).

La spécificité des amplifications des séquences méthylées et non méthylées des différents promoteurs étudiés a été préalablement vérifiée par séquençage Sanger des fragments amplifiés comme l'illustre la représentation des alignements de séquences (Figure 53).

II. Etude Bio-MAPS : Analyse des prélèvements tumoraux des patients inclus dans l'essai MAPS

Les différentes étapes de l'IHC pour les différents kits de détection (Novolink[®], Envision[®] et Anti-Goat HRP-DAB Cell[®]), seront détaillés plus loin dans ce manuscrit ([section Résultats partie I et III](#)).

Tableau 7 : Présentation des principales caractéristiques connues des cinq lignées cellulaires de MPM au début de ce travail (H2452, H2052, H28, Met5A et MSTO-211H).

	H2452	H2052	H28	MSTO-211H	Met-5A
Aspect en 2D (MO, x10)					
Aspect en agar (MO, x20)					
Histologie (d'après l'ATCC)	épithélioïde	Sarcoma-toïde	épithélioïde	mixte	épithélioïde
Donneur	Homme, Âge NR	Homme, 65 ans	Homme, 48 ans	Homme, 62 ans	Donneur sain
Principales altérations répertoriées	NR	P16 – RASSF1A – LATS2- NF2-	RASSF1A -	ERalpha - et ERbéta -	NR
Tumorigénicité (d'après littérature)	oui	oui	oui	oui	non

Ces lignées proviennent de l'ATCC et leur type histologique a été établi d'après leurs fiches de données. Les photos ont été prises au microscope optique (MO) à contraste de phase (x10) après 48h de culture dans du milieu RPMI 10% SVF à 37°C en atmosphère humidifiée de 95% d'air/5% CO2 ou au terme de 10 jours de croissance en agar. NR : Non renseigné, ER : récepteur aux œstrogènes.

III. Etudes in cell:

III.A. Lignées cellulaires

Notre groupe a acquis auprès de l'ATCC (American Tissue Culture Collection), les 5 lignées cellulaires les plus employées dans la littérature étudiant les caractéristiques des MPM : les lignées H2452, H2052, H28, Met-5A, MSTO-211H. Ces lignées ont également été choisies parce qu'elles sont de sous-types histologiques différents et qu'elles ont un nombre plus ou moins important d'altérations moléculaires connues (Tableau 7). La lignée Met-5A, lignée non tumorigène, a été obtenue par immortalisation de cellules mésothéliales normales par transfection d'un vecteur viral SV40 et il s'agit a priori d'une lignée ayant peu d'altérations moléculaires, étant seulement immortalisée et non transformée. Les lignées H2452, H2052, H28 et MSTO-211H proviennent quant à elles de la mise en culture de pleurésie de mésothéliomes humains : il s'agit donc de lignées tumorales et d'ailleurs tumorigènes sur souris nude.

III.B. Culture cellulaire

Les lignées mésothéliales sont cultivées dans un milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute) supplémenté avec 10% de SVFi (Sérum de Veau Fœtal inactivé), 10mM de L-Glutamine, des antibiotiques (100 µl/ml de Kanamycine, 100µl/ml Streptavidine/Penicilline) et un antifongique (0,25µg/ml de Fungizone). Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37°C en atmosphère humidifiée de 95% d'air et 5% de CO₂. A confluence, les cellules sont collectées après incubation avec la trypsine, puis ré-encemencées après comptage à l'aide d'une cellule de Thoma.

Les caractéristiques de ces différentes lignées cellulaires ainsi que leurs anomalies (et en particulier les anomalies touchant la voie RASSF/Hippo) sont résumées dans le [Tableau 7](#).

Il faut avoir qu'au début de ce travail les altérations des lignées mésothéliales n'étaient pas clairement répertoriées dans les banques de données ou par l'ATCC elle-même.

Nous avons alors caractérisé les lignées de MPM en évaluant le statut de méthylation des promoteurs des gènes RASSF/Hippo par MS-PCR et quantifié le niveau protéique (WB/IF) et de messager (qPCR) à la fois des acteurs de la voie de signalisation RASSF/Hippo et de certains membres de leur interactome ([décrit section Résultats](#)).

Nous avons ensuite voulu comprendre ce qui se passait aux moments de la carcinogénèse pleurale, pour cela nous avons mimé au moyen d'ARN interférents la perte d'expression de certains acteurs de la voie Hippo, voie fréquemment altérée dans le MPM.

Nous avons au préalable déterminé les concentrations adéquates en siARN et plasmide pour induire la perte d'expression et/ou la réexpression de nos différentes cibles dans quatre lignées cellulaires mésothéliales humaines (MSTO-211H, H2452, H28 et H2052), ces données seront décrites dans les différentes parties de la section Résultats.

III.C. Extraction des ARNs (Acides ribonucléiques) totaux

Les ARNs totaux sont extraits selon les recommandations du Kit *GE Healthcare*®.

Le tapis cellulaire est gratté dans du tampon de lyse RA1 supplémenté avec du β -Mercapto-Ethanol (β -Me), ce lysat est vortexé puis centrifugé (11000 rpm, 1min). Le surnageant est mélangé à de l'éthanol 70% au vortex. L'homogénat est ensuite placé sur une colonne puis élué par centrifugation (8000 rpm, 30 sec). Les ARNs alors piégés sur la membrane de silice, sont dessalés par le tampon MDM par centrifugation (11000 rpm, 1 min). L'éluât est ensuite éliminé et la colonne replacée sur un nouveau tube collecteur. Les ADNs sont digérés par une solution de DNaseI diluée à 10% dans du tampon de réaction, pendant 15 minutes à température ambiante. Cette réaction est stoppée par un tampon inactivateur RA2, éliminé par centrifugation (11000 rpm, 1 min). La membrane est ensuite lavée 2 fois par le tampon RA3 et centrifugation (11000 rpm, 1 puis 2 min). Enfin, les ARNs sont élués avec 40 μ l d'eau sans RNase par centrifugation (11000g, 1 min). La concentration des ARNs est alors déterminée par mesure de la densité optique à 260nm au NanoDrop 2000c®. Leur pureté est estimée par les ratios de l'absorbance à 260nm/280nm et 260nm/230nm.

III.D. Transcription inverse et Réaction de polymérisation en Chaîne (RT-PCR)

III.D.1. Transcription inverse (RT)

Les ARNs (500 ng) sont rétro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc) par l'action d'une transcriptase inverse. Le mélange réactionnel pour réaliser la RT est composé de tampon 5X, dNTP, random Primer, RNase Inhibitor, M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Un contrôle négatif (RT-) est réalisé en remplaçant les ARNs par de l'eau sans nucléase. La réaction est effectuée 1h30 à 37°C dans l'appareil Mastercycler Eppendorf®, puis arrêtée par incubation 5 min à 95°C.

Tableau 8 : Séquences des différents couples d'amorces employées pour les amplifications par PCR.

Amorce	Séquence (5' vers 3')
GAPDH, gène de ménage	Sens: GAA GGT GAA GGT CGG ATG C Antisens: GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC
MST1	Sens: GTA GCC AGC ACC ATG ACT GA Antisens:: TTG CCA AAG CTG TTG ATC TG
MST2	Sens: CTG AGT GAA GAC AGT TTG ACT Antisens: CGA CAA CTT GAC CGG ATT CC
LATS1	Sens: TCT GTG ACT GGT GGA GTG TTG Anti-sens: CTT CTG CTC CTG AAG GCT TTG
WW45	Sens: ATACTGCAGAAATTCCTGAC Antisens: GCATTTATTAACCAGAGTAC
Kibra	Sens: CTCCGAGGCCAGAGCTGTAAGGAAC Antisens: CTAGAGGACTTGTGACTCAGTAC
NF2	Sens: TCAATTGCGAGATGAAGTGGAA Antisens: GTGTCCTTGATTGTGTACTG
YAP	Sens : GCC GGA GCC CAA ATC C Antisens: GCA GAG AAG CTG GAG AGG AAT G
TAZ	Sens: ACCCACCACGATGACCCCA Antisens: GCACCCTAACCCAGGCCAC
RASSF1A	Sens: GGG GTC GTC CGC AAA GGC C Antisens: GGG TGG CTT CTT GCT GGA GGG
RASSF2A	Sens : GCG CCT AGA ACG TGT TTT TC AntiSens : ACT AGG CGT CCT CAC ATT GC
cTGF	Sens: AGG AGT GGG TGT GTG ACG A Antisens: CCA GGC AGT TGG CTG TAA TC
ANKDR1	Sens: AGT AGA GGA ACT GGT CAC TGG Antisens: TGG GCT AGA AGT GTC TTC AGA T
Amphiréguline (AREG)	Sens: TGC TGG ATT GGA CCT CAA TG Antisens: TCC CGA GGA CGG TTC ACT AC

III.D.2. Réaction de polymérisation en Chaîne (PCR) en temps réel

Les ADNc (5 µl de RT préalablement diluée au 1/100^e) sont amplifiés, dans l'appareil Stratagene Mx3005P d'Agilent Technologies, en présence d'un fluorochrome s'intercalant dans les doubles brins synthétisés (SYBR Green) dans du Mix PCR (Mix GoTaq 1X, ROX 1X, 5 pmoles de chaque amorce (amorce sens et antisens) (Tableau 8) et de l'eau RNase free). A noter que nous avons systématiquement réalisé, un contrôle négatif (PCR-) ainsi qu'un contrôle positif (PCR+). L'amplification est réalisée selon un programme se déroulant en 3 étapes :

1) Activation de l'enzyme (3 min, 95°C), **2)** un cycle répété 40 fois comprenant deux étapes, l'une de dénaturation (30 sec, 95°C) et l'une d'hybridation des amorces/polymérisation (1 min, 60°C) et **3)** une dernière étape de 1 min à 95°C, 30 sec à 55°C et 30 sec à 95°C. L'expression de chaque gène d'intérêt est rapportée à celle d'un gène de référence (GAPDH), seule gène à varier de moins d'un Ct entre les cinq lignées parmi le panel de gène de ménage testé (GAPDH, actine, S16, tubuline). L'expression relative des gènes est calculée en utilisant la méthode comparative des Ct ($2^{(Ct(\text{gène de référence}) - Ct(\text{gène cible}))}$).

III.D.3. Réaction de polymérisation en Chaîne (PCR) semi-quantitative

Les ADNc (6µl de RT) sont incubés dans un volume final de 29 µl, en présence de 200 µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de chaque amorce (sens et antisens (Tableau 8)), 1,5 UI de Taq polymérase et d'un tampon PCR 5X. Un contrôle PCR - et + sont réalisés.

La réaction d'amplification effectuée dans l'appareil Mastercycler Eppendorf®, commence par une étape de dénaturation (5 min à 94°C), suivi de 35 cycles d'amplification comprenant: une étape de dénaturation (30 sec à 94 °C), une étape d'hybridation (30 sec à 62°C) et une étape de polymérisation (60 sec à 72°C) et pour finir, une étape d'élongation est effectuée 5 min à 72°C.

Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite visualisés sous UV sur gel d'agarose 2,5% contenant chacun 1% d'agent intercalant de l'ADN (GelRed) après électrophorèse dans un courant électrique continu de 100V pendant 30 à 50 min. L'expression de chaque gène d'intérêt est rapportée à celles du gène de référence, la GADPH.

Tableau 9 : Anticorps primaires utilisés pour l'immunodétection du Western Blot (WB) et/ou de l'immunofluorescence (IF).

Anticorps primaires	Caractéristiques	Dilution pour WB	Dilution pour IF
WW45	lapin polyclonal	1/1000 ^{ème}	/
YAP/TAZ (D24E4)	lapin monoclonal	1/1000 ^{ème}	/
P-YAP	lapin polyclonal	1/1000 ^{ème}	/
YAP	lapin polyclonal	1/1000 ^{ème}	1/100 ^{ème}
Actine	lapin monoclonal	1/1000 ^{ème}	/
RASSF1A	lapin polyclonal	/	1/200 ^{ème}
NF2	lapin polyclonal	/	1/50 ^{ème}
TAZ	lapin polyclonal	1/1000 ^{ème}	1/100 ^{ème}
CD44 standard	lapin monoclonal	/	1/50 ^{ème}
E-Cadhérine (24E10)	lapin monoclonal	/	1/100 ^{ème}
Syndécan-1	chèvre polyclonal	/	1/100 ^{ème}
Vimentine (D21H3)	lapin monoclonal	/	1/200 ^{ème}
N-cadhérine (8C11)	souris monoclonal	/	1/100 ^{ème}

III.E. Détection protéique...

III.E.1. ...par Immunofluorescence (IF)

Au terme des incubations, les cellules sont rincées au PBS-Ca²⁺ et fixées 20 minutes à 37°C par une solution de para-formaldéhyde 4%. Les tapis cellulaires sont ensuite lavés 3 fois dans du PBS-Ca²⁺, puis les cellules sont perméabilisées avec du méthanol à -20°C pendant 10 minutes. Après trois nouveaux lavages au PBS sans Ca²⁺, les lamelles sont conservées à -4°C jusqu'à l'immunomarquage.

Pour réaliser celui-ci, les cellules sont rincées puis incubées 1h en présence d'un tampon de blocage des sites non spécifiques (PBS contenant 0,3% de tritonX100 et 5% de SVF) à température ambiante puis 1h sous agitation douce avec l'un des anticorps (Ac) primaires de lapin ou souris (Tableau 9) dilué dans du tampon de dilution (PBS-Ca²⁺ avec 0,3% de triton-X100 et 5% de SVF). Après 3 rinçages au PBS, les cellules sont incubées 1h sous agitation douce en présence de l'Ac secondaire (anti-lapin ou souris) couplé à un AlexaFluor (A488, A546 ou A633) et dilué au 1/300 dans du tampon de dilution.

Les lamelles sont ensuite rincées et montées avec du milieu de montage contenant du colorant fluorescent nucléaire, le Dapi®.

L'analyse des immunomarquages est réalisée à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (FluoView FV1000, Olympus). Les images numériques sont acquises grâce au logiciel FV1000. L'intensité des signaux est quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ.

III.E.2. ...Western Blot (WB)

Au terme des incubations, les protéines sont extraites, les cellules sont lysées dans un tampon d'extraction composé de 20 mM tris-HCL, 20% de glycérol, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA (Éthylène Diamine Tetra acétique Acid) et 0,1% de TritonX100 supplémenté extemporanément d'1% d'anti-protéase, 1% de DTT (DithioThréitol) et 0,1% de β-ME. Le tapis cellulaire prélevé est passé au sonicateur pendant 10 secondes. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford. Le standard utilisé pour réaliser la droite d'étalonnage est la BSA (Bovine Serum Albumin) (gamme allant de 1 à 20 µg). La DO est mesurée à 590 nm par le spectrophotomètre « UVIKON 860 ».

Les protéines (20 à 40µg) diluées dans un tampon de charge (50 mM Tris-HCL, 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 10% glycérol, 1% β-ME, 12,5 mM EDTA et 0,02% de bleu de Bromophénol) sont dénaturées 5 minutes à 95°C puis séparées sur un gel SDS-

Polyacrylamide 10% dans un champ électrique continu de 40 mA pendant 1h30 dans un tampon de migration 1X (25 mM Tris-base, 192 mM glycine et 0,1% SDS, pH 6,8). Après séparation, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL Amersham®) dans un champ électrique continu de 100V, pendant 45 min à 4°C en présence de tampon de transfert (25 mM Tris-base, 200 mM glycine et 20% méthanol).

La qualité du transfert et de la séparation des protéines sont vérifiées par une coloration transitoire au rouge Ponceau. La membrane est lavée au PBS puis incubée 1h à température ambiante, dans du tampon de blocage (TBS-T 1X (Tris Buffered Saline-Tween): 200 mM Tris-base, 150 mM NaCl et 0,1% Tween-20) contenant 5% de lait en poudre. La membrane est ensuite rincée dans du TBS-T et incubée, sous agitation, pendant une nuit à 4°C en présence de l'Ac primaire (Ac de lapin dirigé contre les protéines étudiées, [Tableau 9](#)) dilué au 1/1000 dans du TBS-T. A l'issue de l'incubation, la membrane est lavée 5 fois 5 min dans du TBS-T et incubée 1h avec l'Ac IIaire (Ac de chèvre anti-IgG de lapin) dilué au 1/2000 dans du TBS-T, sous agitation, puis lavée 5 fois 5 min dans du TBS-T.

Le complexe Ag/Ac est révélé par le kit ECL (Promega®), et mise en contact de la membrane avec un film auto-radiographique (Kodak®), qui est baigné successivement dans du révélateur puis du fixateur.

L'expression de la protéine est rapportée à celle de la GAPDH; la membrane de nitrocellulose est réhydratée dans 2 bains de 10 min de T-BST puis déshybridée 30 min à 58°C dans un tampon de désybridation (100 mM β -ME, 2% SDS et 62,5mM Tris-HCL).

La membrane est lavée 5 fois dans du TBS-T puis le protocole est repris à l'étape du blocage comme précédemment. La quantification est réalisée par analyse des auto-radiogrammes avec le logiciel ImageJ.

III.F. Test de Mort Cellulaire Programmée

III.F.1. Mesure de l'activité Caspase 3/7

A 48h post-transfection, 100 μ l de solution Caspase Glo (Promega ®) est ajouté à chaque puits. La plaque de culture est ensuite agitée doucement pendant 30 secondes et incubée pendant 2 heures à température ambiante. A l'issue de l'incubation, la luminescence est mesurée au luminomètre (Flexstation, Berthold®).

III.F.2. Test de Fragmentation d'ADN (kit Cell Death Detection ELISA Roche®)

A 48h post-transfection, le milieu de culture est prélevé et 200 µl de *Lysis Buffer* est ajouté à chaque puits de culture. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la plaque est centrifugée (10 min, 200 rpm). Vingt µl du surnageant de chaque puits est transféré dans une plaque pré-coatée streptavidine puis une solution d'immunoreagent (composée d'incubation Buffer, d'Anti-Histone et d'Anti-DNA-POD) est ajoutée à chaque puits. La plaque, recouverte d'un adhésif, est agitée pendant 2h à température ambiante. Chaque puits est ensuite lavé 3 fois à l'aide de l'incubation Buffer et 100 µl de solution ABTS Solution Tablet est distribuée par puits. Après 10 minutes d'incubation sous agitation douce, la solution ABTS Solution Stop est ajoutée pour stopper la réaction. A noter, qu'afin de garantir la bonne fonctionnalité du test, des contrôles positifs et négatifs sont réalisés systématiquement. La fragmentation de l'ADN est déterminée par mesure de la densité optique à 405 nm au spectrophotomètre (Σ960Metertech).

III.G. Incorporation de BrdU (Millipore®)

A 24h post-transfection, les tapis cellulaires sont lavés avec du PBS et le milieu est remplacé par un milieu RPMI complet avec ou sans BrdU dilué (1/500), analogue de la thymidine s'incorporant dans les brins d'ADN nouvellement synthétisés lors de la prolifération cellulaire. A noter, que nous avons réalisé parallèlement à nos puits testés des contrôles négatifs en ajoutant de la mitomycine C (1 µg/µl), à une concentration empêchant la prolifération cellulaire mais sans entraîner la mort cellulaire.

Après 24h ou 48h d'incubation, les cellules sont fixées en présence de la solution de fixation 30 minutes à température ambiante. Après 3 lavages au wash buffer, les cellules sont incubées 1 heure en présence d'un anticorps primaire monoclonal de souris permettant la détection du BrdU. Chaque puits est de nouveau rincé 3 fois et la solution d'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (dilution 1/2000) est ajoutée. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 3 lavages au wash buffer et 1 lavage à l'eau distillée sont réalisés. Enfin, les tapis cellulaires sont incubés en présence du substrat de la peroxydase 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Après l'ajout de la solution stop, la quantité de BrdU incorporée est déterminée par mesure de la densité optique à 450 nm (Σ960Metertech).

III.H. Invasion cellulaire en Matrigel®

A 24h post-transfection, les cellules sont réensemencées dans des inserts équipés d'une membrane poreuse recouverte de Matrigel®, dont la composition est considérée comme analogue à celle de la lame basale sous-jacente à l'épithélium, avec du milieu RPMI sans additif (10mM L-Glutamine et 10% de SVF) supplémenté en mitomycine C (3µl/ml). Les inserts sont placés dans des puits de culture (plaque 24 puits) contenant du milieu RPMI avec additifs et HGF (40 ng/µl) supplémenté en mitomycine C. Après 48h d'incubation, le milieu contenu dans l'insert est aspiré et l'excès de Matrigel® est éliminé à l'aide d'un coton-tige (cf Figure 57, section Résultats partie I.B). Les cellules ayant digérées la matrice et migrées à travers la membrane poreuse sont colorées au crystal violet. Une fois rincée, la membrane poreuse est découpée à l'aide d'un scalpel et montée avec du glycérol entre lame et lamelle, les cellules sont alors comptées au microscope inversé à contraste de phase (leica DM IL LED).

III.I. Croissance cellulaire sans adhésion

III.I.1. Culture 3D Nunclon Sphera BD®

A 24h post-transfection, les cellules sont réensemencées avec du milieu complet, dans des plaques 24 puits sans adhésion, du milieu frais est ajouté tous les 2 jours. La capacité des différentes lignées à former des sphères selon les traitements est appréciée en photographiant les cellules au 6^{ème} jour du test au grossissement x10 sous un microscope inversé à contraste de phase. Le diamètre des sphères est également mesuré (cf Figure 57, section Résultats partie I.B).

III.I.2. Croissance en agar (Millipore®)

A 24h post-transfection, les cellules sont réensemencées dans 0,4% d'agarose et RPMI complet (4 puits/conditions), au-dessus d'une couche de 0,8% d'agarose et de RPMI complet. Du milieu complet est ajouté tous les 2 jours. Afin de suivre la cinétique d'apparition des colonies selon les traitements et les lignées, des photos sont prises au grossissement x10 au moment de l'ensemencement puis tous les 2 jours jusqu'à 21 jours. Au terme du test, le nombre de colonies et leurs diamètres sont évalués (cf Figure 57, section Résultats partie I.B).

III.J. Evaluation de l'activité des MMP2/9 par zymographie

Le zymogramme est réalisé par migration électrophorétique d'un aliquot des milieux de culture prélevés au cours du test de cicatrisation dans un gel SDS-Polyacrylamide 7% contenant de la gélatine (1 mg/ml ; le substrat des métalloprotéases). Les dépôts contiennent 15 µL d'échantillon et 15 µL de tampon de charge (Biorad), (10µl + 10µl pour témoin MMP2 et MMP9, enzymes recombinantes commerciales (R&D)). L'électrophorèse en condition dénaturante, s'effectue dans un tampon de migration 1X (25 mM Tris-base, 192 mM glycine et 0,1% SDS, pH 6.8), pendant environ 2h avec deux gels d'acrylamides: un gel de séparation de 7% (20 mA) et un gel de concentration 4.5% (30 mA) permettant aux échantillons de rentrer dans le gel de séparation en même temps en les concentrant. Après la migration, le gel est plongé 2 fois pendant 10 min dans une solution de Triton X100 à 2,5%, sous agitation afin d'éliminer le SDS. Trois rinçages rapides à l'eau distillée puis deux de 20 min sont réalisés afin d'éliminer le Triton X100. Le gel est ensuite incubé une nuit à 37°C dans le tampon de réaction (50 mM Tris-base, 5 mM CaCl₂, 2H₂O et 2µM ZnCl₂, pH8). La révélation se fait par coloration du gel pendant 1 à 2 h dans une solution de coloration (0,1% bleu de Coomassie + décolorant (25% d'éthanol - 10% d'acide acétique)) suivie d'une décoloration progressive avec le décolorant seul jusqu'à apparition de bandes claires.

IV. Statistiques

Analyse des prélèvements tumoraux des patients inclus dans l'essai MAPS : Une première étape est d'abord mise en œuvre, pour éliminer les marqueurs les moins pertinents. Dans ce but, des modèles de Cox n'ajustant pas sur les facteurs de confusion ont été utilisés pour tester l'interaction entre chaque marqueur et le bras de traitement. Seuls les marqueurs pour lesquels le degré de signification de ce test d'interaction est inférieur à 0,20 ont été conservés pour la suite de l'analyse. Un modèle de Cox multivarié descendant a ensuite été appliqué sur les variables âge, PS, sexe, type histologique, TNM IMIG, exposition professionnelle à l'amiante, leucocytose, thrombocytose afin de déterminer des facteurs pronostiques de la survie sur l'ensemble des 2 groupes de traitement. Les variables significatives à $p < 0,20$ dans ce modèle ont été considérées comme des facteurs de confusion potentiels.

Pour chaque marqueur sélectionné, un modèle de Cox multivarié prenant en compte le marqueur, le bras de traitement, l'interaction marqueur \times traitement, les cofacteurs identifiés à l'étape 2, a été mis en œuvre. L'influence du marqueur a été évaluée en testant le terme d'interaction de ce modèle.

La prise en compte d'éventuelles interactions non linéaires a été assurée par une approche basée sur les polynômes fractionnels (Royston et Sauerbrei, 2004). La procédure séquentielle de Bonferroni-Holm a été utilisée pour corriger les degrés de signification des tests d'interaction des marqueurs sélectionnés afin de limiter à 5% le risque α global sur cette 3ème étape. A partir des modèles obtenus, les taux de survie et risques relatifs de décès ajustés ont pu être calculés en fonction des niveaux du marqueur et du bras d'étude.

Analyses statistiques des études *in cell* : l'analyse des différences observées entre les différentes conditions dans les tests cellulaires est réalisée à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) suivi d'un test post-hoc de Dunnett, test permettant de comparer toutes les conditions testées à un seul contrôle (condition siNeg). Les différences sont considérées comme significatives dès $p < 0,05$.

V. Ethique

L'étude Bio-MAPS (PHRC national 2007) a fait l'objet d'un avis favorable du CPP (Comité de protection des personnes) du CHU de Caen en 2007, avec un formulaire spécifique de consentement pour la partie « biomarqueurs » de l'essai (promoteur CHU de Caen pour la phase 2, IFCT pour la phase 3 ; PI coordonnateur : Pr.G. Zalcman) (**Annexe**).

Résultats

I. La voie RASSF/Hippo est fréquemment perturbée dans le mésothéliome pleural malin : l'inactivation de MST1 prédit un moins bon pronostic chez les patients atteints de MPM car elle favorise l'invasion, la croissance sans adhésion, la prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules mésothéliales tumorales

I.A. L'hyperméthylation du promoteur du gène *MST1* prédit une moins bonne survie des patients atteints de MPM et inclus dans l'essai MAPS

Afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs du MPM, nous avons caractérisé sur un plan moléculaire les prélèvements des patients atteints de MPM et inclus dans l'essai MAPS. Les statuts de méthylation des promoteurs des gènes des membres de la voie Hippo (RASSF1A, RASSF2A, RASSF5, RASSF6, RASSF10, MST1, MST2, LATS1, LATS2) ont été déterminés par MS-PCR.

L'analyse du statut de méthylation des promoteurs de la voie RASSF/Hippo des prélèvements des 226 patients inclus dans MAPS pour lesquels nous avons les blocs en paraffine (et donc pouvions extraire l'ADN), a confirmé que cette voie de signalisation est fréquemment inactivée dans le MPM (42% des patients présentent au moins une altération de l'un des membres de la voie Hippo, les hyperméthylations des promoteurs variant de 0 à 21,5% selon le membre considéré). En effet, parmi les promoteurs de gènes RASSF étudiés, RASSF1A, RASSF2A, RASSF6 et RASSF10 sont inactivés avec une fréquence respective de 11,1%, 14,5%, 21,5% et 4,4% tandis qu'aucune méthylation du promoteur de RASSF5, n'était détectée dans ces prélèvements. Parmi les kinases de la voie Hippo, seul le promoteur du gène MST1 présente une fréquente hyperméthylation (9,4%), aucune hyperméthylation des promoteurs des autres kinases n'ayant été retrouvée. Aucune des méthylations observées dans cette population ne s'est avérée exclusive, les prélèvements pouvant ainsi être porteurs d'inactivation de plusieurs membres de cette voie RASSF/Hippo.

L'influence de chaque marqueur sur la survie et la réponse des patients a ensuite été évaluée au sein de l'unité de Biostatistique du CHU de Caen (Christian Creveuil, PhD, MCU Biostatistique), en collaboration avec l'équipe de l'IFCT (Alexandra Langlais, PhD Biostatistique). La corrélation des statuts de méthylation aux données cliniques des patients inclus dans l'essai MAPS (survie sans progression, survie globale et réponse aux traitements) a révélé que les patients dont la tumeur exprime MST1 sont de meilleur pronostic que ceux présentant une hyperméthylation de MST1 dans leur tumeur : en effet, leur médiane de survie globale est estimée à 19,3 mois *versus* 13 mois chez les patients avec une tumeur n'exprimant plus cette kinase (HR 2,40 ; IC95 [1,48-3,90], $p < 0,001$). A ce jour, ce lien entre l'inactivation de la kinase MST1 et son impact sur la survie de patients atteints de MPM n'avait jamais été mis en évidence à notre connaissance et a donc été analysé plus en profondeur faisant l'objet d'un article en cours de finalisation (partie I.C, section résultats).

Etonnamment, l'inactivation des autres membres de la voie Hippo et en particulier de RASSF1A n'avait aucune valeur pronostique sur la survie des patients atteints d'un MPM et inclus dans MAPS. Les fréquences de ces hyperméthylations se sont avérées également différentes (inférieures) de ce qui était rapporté dans la littérature (Destro *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2012; Toyooka *et al.*, 2002).

L'essai MAPS est le plus grand essai clinique européen académique, ayant permis d'enrôler des patients selon une procédure standardisée et une prise en charge thérapeutique homogène, ce qui n'est pas le cas des quelques études publiées sur les fréquences d'inactivation et notamment de RASSF1A (Destro *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2006; Toyooka *et al.*, 2002).

Il est raisonnable de penser que la représentation des fréquences de méthylation des gènes de la voie RASSF/Hippo est plus juste dans cette cohorte puisque l'effectif est plus grand et que cette cohorte présente peu de biais de sélection. L'inactivation de RASSF1A contribue à la carcinogenèse pleurale sans en être un précurseur, ce qui pourrait expliquer l'absence de valeur pronostique de cette anomalie moléculaire, et qui pourrait également s'expliquer par la nature particulière des cellules mésothéliales.

RASSF1A est en effet un gardien du phénotype épithélial, mais les cellules mésothéliales, d'origine mésodermique, sont des cellules épithéliales à part, car elles présentent déjà des caractères mésenchymateux. La contribution de RASSF1A dans la carcinogenèse pleurale pourrait alors davantage s'expliquer de par le contrôle que cette protéine exerce sur MST1 (Oh *et al.*, 2006) et l'activité de YAP (Dubois *et al.*, 2016).

Tableau 10 : Caractérisation des cinq lignées cellulaires de MPM (H2452, H2052, H28, MSTO-211H, Met-5A).

	H2052 (sarcomatoïde)	H28 (épithélioïde)	H2452 (épithélioïde)	MSTO- 211H (mixte)	Met-5A
RASSF1A ¹²	hyperméthylée*	hyperméthylée*	++	+	+++
RASSF2A ¹²	hyperméthylée*	hyperméthylée*	++	+	sauvage [§]
NF2 ¹²	+ R341X [§]	+++ sauvage [§]	++ sauvage [§]	+ sauvage [§]	+ sauvage [§]
Kibra ¹²	++	+++	++	++	+
WW45 ¹³	++ sauvage [§]	++ sauvage [§]	+ sauvage [§]	+++ sauvage [§]	+++ sauvage [§]
YAP ¹²³	+++	+	++	++	+
TAZ ¹²³	++	+++	++	++	++
LATS1 ¹	++	++	++	Ø [£]	++
LATS2	délétion homozygote [§]	sauvage [§]	sauvage [§]	délétion exon 6 [§]	sauvage [§]
MST1 ^{1*}	+++	+	+	++	++
MST2 ¹	+++	+	+	+	+
statut p16	Délétion homozygote [¤]	Délétion hétérozygote [¤]	Délétion homozygote [¤]	Délétion hétérozygote [¤]	Pas de délétion

* : méthylation vérifiée par MS-PCR

§ : d'après Murakami et al., 2011

¤ : FISH p16 réalisée au sein du service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU de Caen.

£ : LATS1 D'après Miyanaga et al., 2015

Technique utilisée: 1: RT-PCR

2 : IF

3 : WB

Dans la suite de ce travail de thèse, nous avons cherché à comprendre quelles fonctions et signalisations essentielles à l'homéostasie cellulaire, sont perturbées lors du processus de transformation des cellules mésothéliales, en étudiant l'impact de l'inactivation de MST1, dans des cellules de lignées mésothéliales humaines tumorales afin de comprendre en quoi l'inactivation de cette kinase influence la survie des patients atteints de MPM (article 1 en préparation, partie I.C)

Pour mener cet objectif à bien, nous avons dû au préalable caractériser et identifier des modèles cellulaires pertinents. En effet, de nombreuses lignées sont employées dans la littérature mais leurs caractéristiques moléculaires sont peu connues et nous devons connaître l'état d'activité de la voie RASSF/NF2/Hippo de ces modèles pour interpréter correctement nos résultats.

I.B. Identification et caractérisation de modèles cellulaires d'étude du MPM

Comme décrit dans la section Matériel et méthodes, les anomalies moléculaires portées par ces lignées mésothéliales n'étaient pas clairement répertoriées dans les banques de données ou par l'ATCC elle-même (Tableau 7). Nous avons donc dû dans un premier temps les caractériser afin de pouvoir comprendre et expliquer les possibles différences obtenues entre elles lors des expérimentations ultérieures. Nous avons ainsi évalué le statut de méthylation des promoteurs des gènes RASSF/Hippo par MS-PCR et quantifié le niveau protéique (WB/IF) et messenger (qPCR) à la fois des acteurs de la voie de signalisation RASSF/Hippo et de certains membres de leur interactome. Pour caractériser les cellules des cinq lignées, 24h après l'ensemencement, le milieu de culture est remplacé par du milieu RPMI/L-glutamine avec ou sans SVF (1 ou 10%).

I.B.1. Les cellules des lignées H2052, H28, H2452 et MSTO-221H présentent les altérations récurrentes du MPM

Le taux protéique des acteurs de la voie Hippo décrits pour être parfois altérés dans le MPM sont quantifiés par IF (RASSF1A, NF2, YAP et TAZ) et/ou western Blot (WW45, YAP/TAZ).

Le bilan de la caractérisation des taux des différents membres de la voie Hippo est présenté Tableau 10.

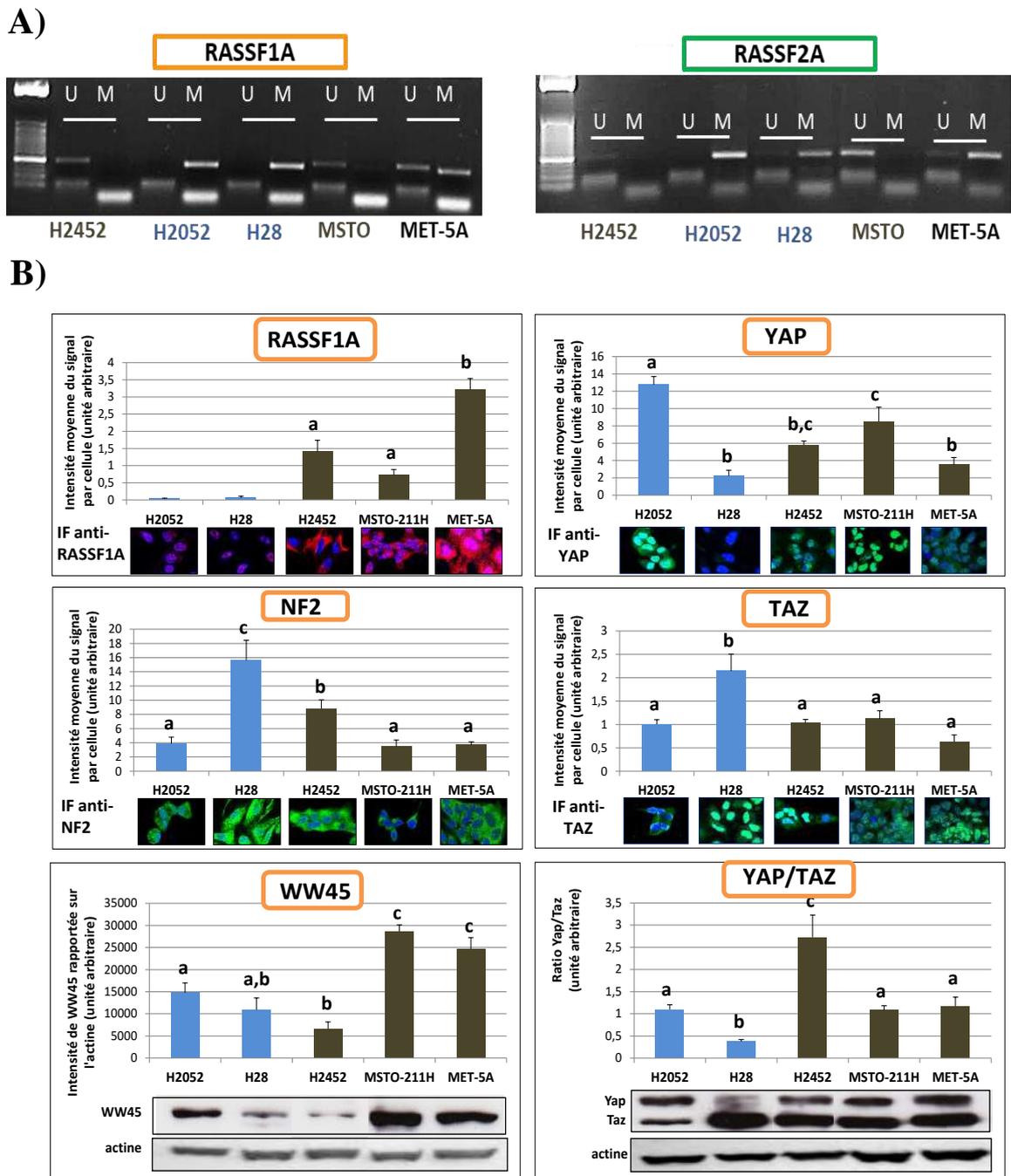


Figure 54: Les cellules des lignées H2052, H28, H2452, MSTO-211H et Met-5A présentent certaines des altérations moléculaires fréquemment décrites dans les MPM.

A) MS-PCR des promoteurs de gène RASSF1A et RASSF2A. B) Les cellules des cinq lignées H2052, H28, H2452, MSTO-211H et Met-5A sont cultivées pendant 48 heures dans du milieu RPMI contenant 10% de SVF. Les protéines sont extraites et la détection des protéines réalisées par IF ou WB puis quantifiées, sous chaque histogramme des photos représentatives de l'expérience.

(n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, des lettres différentes dénotent les différences significatives à $p < 0,05$).

Concernant les régulateurs de la voie Hippo et comme l'illustre la [Figure 54A](#), les cellules des lignées H2452, MSTO-211H et Met-5A expriment RASSF1A et RASSF2A au contraire des cellules des lignées H2052 et H28 qui présentent une hyperméthylation du promoteur de ces gènes, que nous avons confirmée par PCR spécifique de méthylation. Dans la suite de ce travail, les histogrammes bleus correspondront aux cellules n'exprimant pas RASSF1A/2A, les histogrammes bruns, aux cellules exprimant RASSF1A/2A.

Les cellules des lignées H28 et H2452 expriment davantage NF2 que les trois autres lignées ([Figure 54B](#)), et d'après Murakami *et al.*, 2011 seules les cellules de la lignée H2052 portent une mutation ponctuelle R341X pour NF2, les autres lignées exprimant la forme sauvage de NF2 ([Tableau 10](#)).

Concernant l'adaptateur des kinases MST, WW45 : dans les cellules n'exprimant plus RASSF1A/2A (lignées H2052 et H28), les taux de l'adaptateur WW45 sont comparables.

En revanche, dans les lignées exprimant RASSF1A/2A (H2452, MSTO-211H et Met-5A), l'adaptateur WW45 lui varie de façon importante : il est 4X plus exprimé dans les lignées MSTO-211H et Met-5A que dans les cellules de la lignée H2452 ([Figure 54B](#)).

Concernant les kinases de la voie Hippo : les messagers des kinases MST1/2 sont beaucoup plus exprimés dans les cellules des lignées H2052, MSTO-211H et Met-5A tandis que les cellules des lignées H28 et H2452 expriment peu ces messagers. Dans les cellules de la lignée MSTO-211H, les kinases LATS1/2 sont inactivées (Murakami *et al.*, 2011, Miyanaga *et al.*, 2015) tandis que dans la lignée H2052, seule LATS2 est inactivée. Les autres lignées expriment des kinases LATS1/2 sauvages ([Tableau 10](#)).

Concernant les effecteurs : dans les cellules n'exprimant plus RASSF1A/2A (lignées H2052 et H28), les protéines YAP et TAZ sont exprimées de façon inversement proportionnelle : le contenu protéique en YAP de la lignée H2052 est supérieur au contenu en TAZ, tandis que la lignée H28, à l'inverse, exprime plus de TAZ que de YAP.

Dans les lignées exprimant RASSF1A/2A (H2452, MSTO-211H et Met-5A), les taux des effecteurs terminaux varient peu : elles expriment des taux comparables de TAZ et de YAP (seule une différence significative de près de 2 fois est constatée entre la lignée MSTO-211H et Met-5A) ([Figure 54B](#)).

Enfin les lignées H2052 et H2452 présentent également une délétion de p16 (FISH réalisée au sein du service d'Anatomie et Cytologie Pathologique du CHU de Caen).

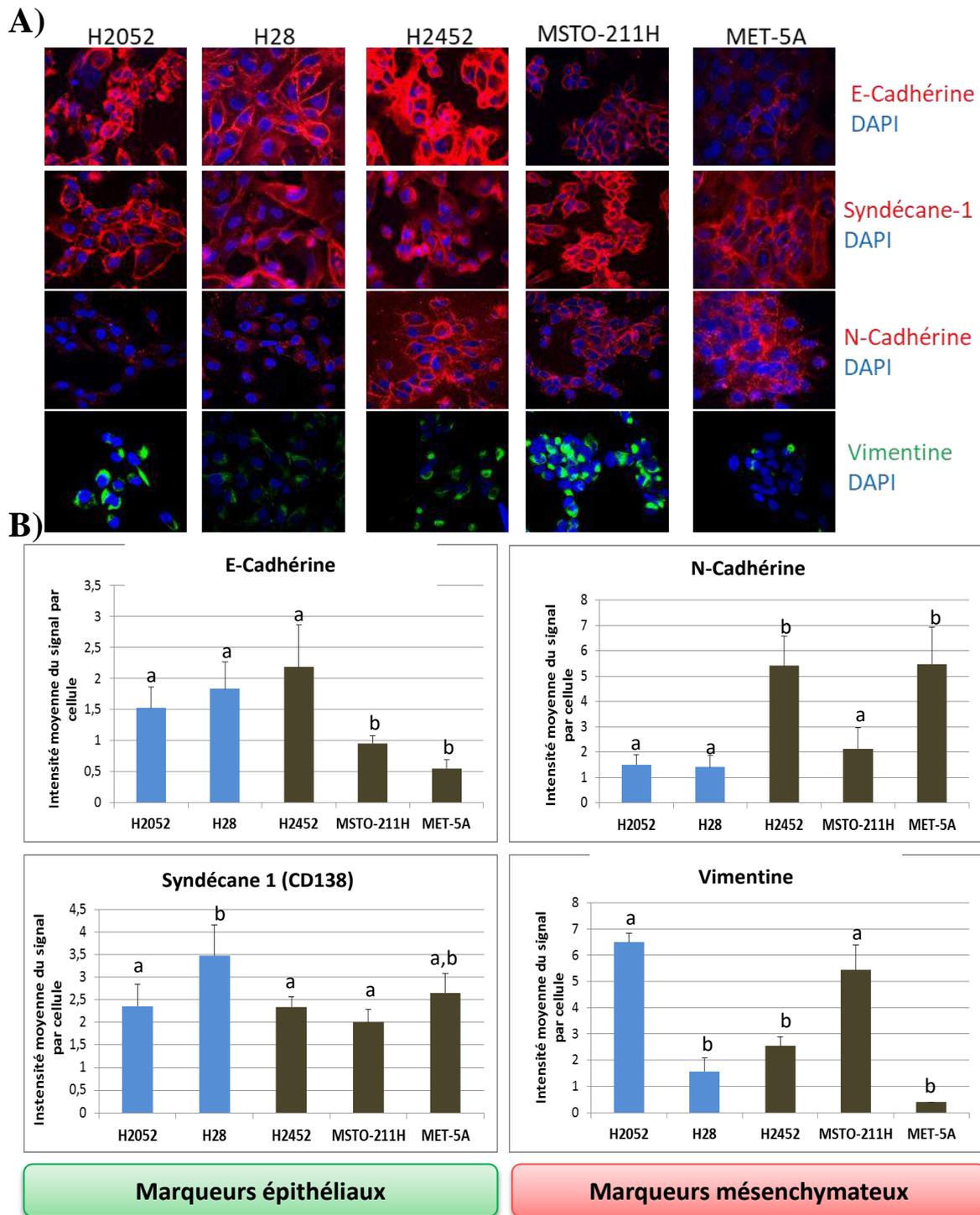


Figure 55: Taux d'expression protéique des marqueurs épithéiaux/mésenchymateux. Les cellules des cinq lignées H2052, H28, H2452, MSTO-211H et Met-5A sont cultivées pendant 48 heures dans du milieu RPMI contenant 10% de SVF. La détection protéique des marqueurs épithéiaux/mésenchymateux est réalisée par immunofluorescence et microscopie confocale. **A)** Photos représentatives du marquage de la E-Cadhérine, le syndécane-1, la N-cadhérine (en rouge) et de la vimentine (vert), le noyau est marqué avec le DAPI (bleu). **B)** Quantification des taux protéiques (n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, des lettres différentes dénotent les différences significatives à $p < 0,05$).

Nous avons également quantifié par IF, l'expression de marqueurs épithélio-mésenchymateux (Figure 55).

Nous confirmons que les cellules de lignées mésothéliales expriment à la fois des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, sans pouvoir attribuer à l'un ou l'autre un phénotype qui serait davantage épithélial ou mésenchymateux, les deux marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux analysés ici n'évoluant pas toujours dans le « même sens ».

Densité
cellulaire

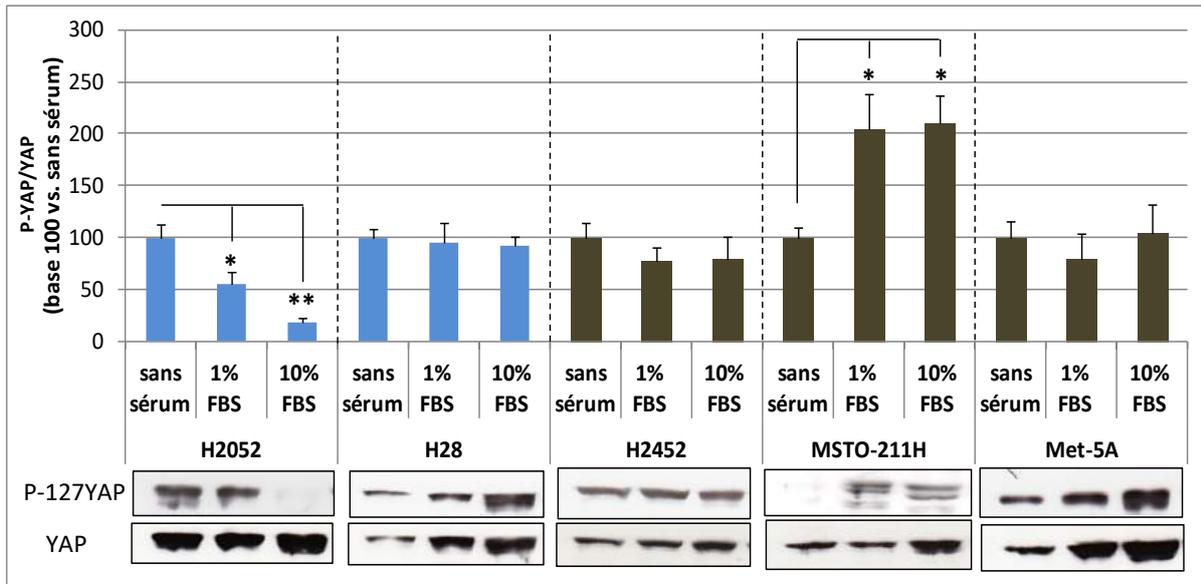


Figure 56 : YAP reste déphosphorylé à confluence dans les cellules de la lignée H2052.

Les cellules des cinq lignées H2052, H28, H2452, MSTO-211H et Met-5A sont cultivées pendant 24 heures dans du milieu RPMI sans sérum, puis pour 24 heures supplémentaire en présence de RPMI sans ou avec 1 ou 10% de sérum. Les protéines sont extraites et la détection de Phospho-127YAP et YAP total par Western Blot sont réalisées puis quantifiées, avec sous les histogrammes des photos représentatives (n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, * vs. condition sans sérum, * : p<0,05, ** : p<0,01).

I.B.2. Fonctionnalité de la voie Hippo dans les cellules de lignées mésothéliales : YAP n'est pas inactivé par la confluence des cellules de la lignée H2052

Afin de déterminer si les altérations identifiées de la voie Hippo dans les cellules des cinq lignées de MPM perturbent son bon fonctionnement (i.e. sa capacité à phosphoryler la Ser127 de l'effecteur terminal YAP, l'inactivant ainsi), les cellules des cinq lignées ont été cultivées 24h en absence de sérum puis 24h supplémentaires en absence ou présence de 1% ou 10% de sérum. Au terme de l'incubation, la phosphorylation de la Ser127 de YAP et YAP total sont quantifiées par WB (Figure 56).

Dans les lignées H28, MSTO-211H et Met-5A, l'augmentation du pourcentage de sérum et donc de la densité cellulaire, fait apparaître ou augmente le signal correspondant à la forme phosphorylée de YAP (comme l'illustrent les images de WB placées sous les histogrammes de la Figure 56) mais augmente aussi de la forme totale, expliquant que les ratios P-Ser127-YAP/YAP soient comparables entre les différentes conditions de culture des lignées H28 et Met-5A.

Dans les cellules de la lignée MSTO-221H, la forme P-Ser127-YAP, à la limite de détection en absence de sérum, augmente davantage que la forme totale en présence de 1% ou 10% sérum. Ainsi, en présence de sérum, le rapport P-Ser127-YAP/YAP est 2 fois plus élevé que dans la condition sans sérum ($p < 0,05$) traduisant l'inactivation de la protéine YAP dans ces conditions ce qui est en accord avec les données de la littérature (Moroishi *et al.*, 2015; Yu *et al.*, 2012).

De façon surprenante, dans la lignée H2452 qui ne présente aucune des altérations des membres de la voie Hippo agissant en amont de YAP (parmi celles que nous avons recherchées), aucune modification de P-Ser127-YAP ou YAP n'est mesurée selon les conditions de culture pouvant faire suspecter une autre altération sur une protéine régulatrice que nous n'avons pas testée (Figure 56).

Enfin, dans les cellules de la lignée H2052 (n'exprimant pas RASSF1A), la présence de 1% de sérum diminue la forme P-Ser127-YAP et celle-ci disparaît quasiment à 10% de sérum, tandis qu'en revanche, comme pour les lignées H28, MSTO-211H et Met-5A, le signal correspondant à la forme totale de YAP est augmenté (Figure 56).

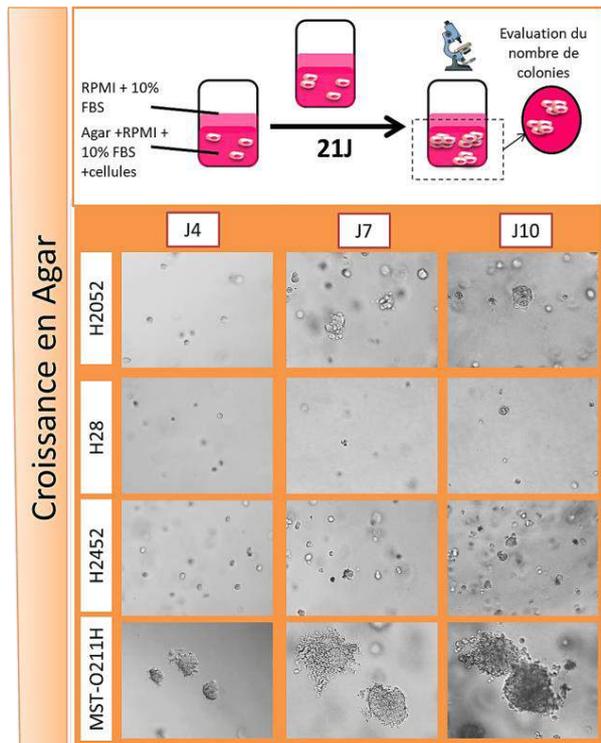
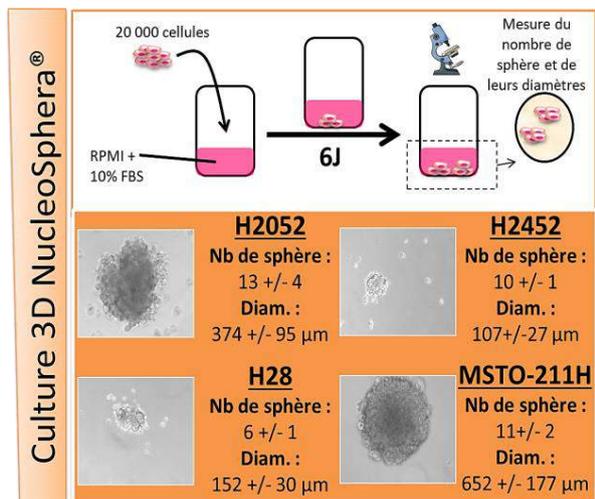
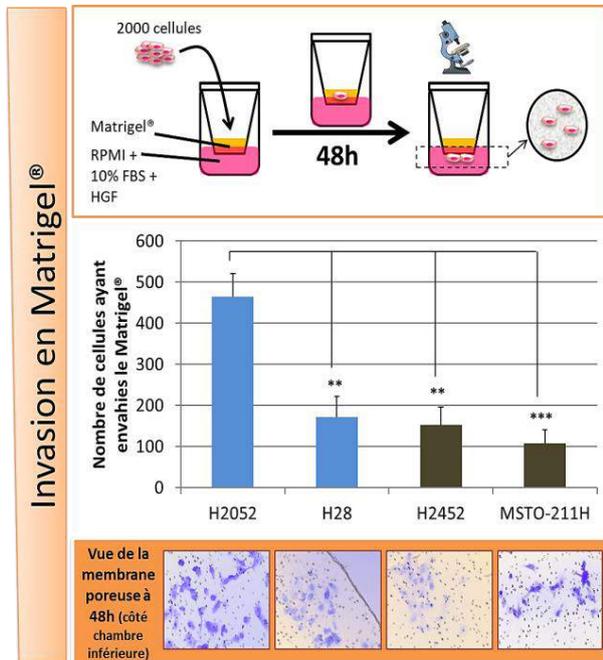


Figure 57: Capacité des cellules à envahir une matrice de Matrigel® ou de croître sans adhésion. Les cellules des lignées H2052 et MSTO-211H ne sont pas affectées par l'absence d'adhésion. Les cellules MSTO-211H envahissent peu le Matrigel® comparées aux cellules H2052 (n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Fischer LSD, **, p<0,01, ***, p<0,001).

L'augmentation du pourcentage de sérum diminue ainsi significativement le rapport P-Ser127YAP/YAP ($p < 0,01$), traduisant une forte activation de YAP dans la condition de culture où les cellules sont confluentes.

A ce stade de la caractérisation des modèles d'étude du MPM, et bien que les cellules de la lignée Met-5A soient le modèle le plus proche de la physiologie, nous avons dû écarter ces cellules pour la suite de ce travail. En effet, leur plus faible capacité de prolifération cellulaire (mesurée par suivie de l'incorporation de Brdu, donnée non montrée) les rendait difficilement manipulables en parallèle des autres lignées. De plus, l'élévation du nombre de passages s'accompagnait d'une accumulation d'anomalies morphologiques cellulaires ; dès le 4^{ème} passage, nous observions de plus en plus de cellules plurinuclées et/ou reliées entre elles par des ponts cellulaires reflétant une perturbation manifeste du bon déroulement du cycle cellulaire.

I.B.3. Le niveau d'expression de YAP est associé à un phénotype invasif et à la capacité des cellules des lignées de MPM à croître sans adhésion

La caractérisation des lignées de MPM employées dans la suite de ce travail a fait apparaître l'existence d'un différentiel entre YAP et TAZ, en particulier, dans les lignées présentant une hyperméthylation de RASSF1A : les lignées H2052 et H28. Les cellules de la lignée H2052 expriment fortement YAP, tandis que les cellules de la lignée H28 expriment fortement TAZ (Figure 54 et Tableau 10). Or, de fait, ces lignées se comportent très différemment dans les tests fonctionnels utilisés pour apprécier l'agressivité de ces cellules (capacité à envahir du Matrigel®, former des sphères ou croître en agar).

Par comparaison aux cellules de la lignée H28, les cellules de la lignée H2052 (YAP+) envahissent davantage le Matrigel®, et sont aptes à former des sphères et des colonies respectivement sur support anti-adhésif et en agar. Elles sont capables de pousser sans adhérence à un support, ce qui constitue une des caractéristiques *in vivo* des cellules des mésothéliomes pleuraux de type épithélioïde, capables de desquamer et proliférer en suspension dans la cavité pleurale au sein de pleurésies néoplasiques (Figure 57).

Nous rapportons ainsi que les cellules qui expriment davantage de YAP (H2052) ont un comportement plus agressif que celles qui en expriment peu (H28).

Les cellules des lignées qui expriment nativement RASSF1A, les lignées MSTO-211H et H2452, présentent aussi ce différentiel d'expression entre YAP et TAZ : la lignée MSTO-211H exprime davantage YAP que de TAZ, la lignée H2452 exprime, quant à elle, davantage TAZ que YAP. Or, de façon intéressante, là encore, si le comportement des cellules de la lignée MSTO-211H dans les tests de migration 2D, d'invasion, de culture sphéroïde et agar est assez comparable à celui des cellules de la lignée H2052 (YAP+), le comportement des cellules H2452 se compare davantage aux cellules H28 (TAZ+).

Tous ces tests fonctionnels « sollicitent » la voie de signalisation Hippo et donc *in fine* les effecteurs YAP/TAZ, ce qui pose la question de la spécificité d'action de ces effecteurs terminaux dans l'agressivité des MPM. YAP pourrait être associé à un phénotype agressif, tandis que l'expression et l'activité de TAZ, serait liée à un phénotype moins agressif.

L'idée que YAP/TAZ puissent avoir des fonctions spécifiques avait été mise en avant par le travail décrivant l'interactome de ces deux co-facteurs identifiant clairement des partenaires communs à YAP et TAZ (TEAD, Runx1/2, smad 1/2/3), mais aussi des partenaires spécifiques de YAP (NF2, PP2A, Smad7, ERBB4, p63, p73) ou de TAZ (PP1A, GLIS3, MYOD, PAX 3/8, Smad4) (Mauviel *et al.*, 2012) .

Depuis la publication de ce travail, de plus en plus d'études indiquent que YAP serait plutôt impliqué dans la cancérogenèse car favorisant la croissance cellulaire/tumorale, tandis que TAZ serait davantage requis pour le développement des cellules souches cancéreuses, à l'instar de ce qui est connu pour les gliomes, la forme la plus fréquente des tumeurs cérébrales primitives (Bhat *et al.*, 2011; Orr *et al.*, 2011).

Une fois les différents modèles cellulaires caractérisés, nous avons tâché de comprendre quelles fonctions et signalisations essentielles à l'homéostasie cellulaire, sont perturbées lors du processus de transformation des cellules mésothéliales suite à l'inactivation de MST1 et ainsi comprendre en quoi l'inactivation de cette kinase pouvait influencer la survie des patients atteints de MPM.

A

siARN	siMST1 5'-GCGGAGCCAAUACUAUGAU-3'	siYAP 5'-CCACCAAGCUAGAUAAAGA-3'	siTAZ 5'-AGGTACTTCTCAATCACA-3'
MSTO-211H	40% ***	76% **	55% **
H2452	40% ***	85% ***	78% ***
H28	90% **	90% ***	70% ***
H2052	62% ***	87% **	81% **

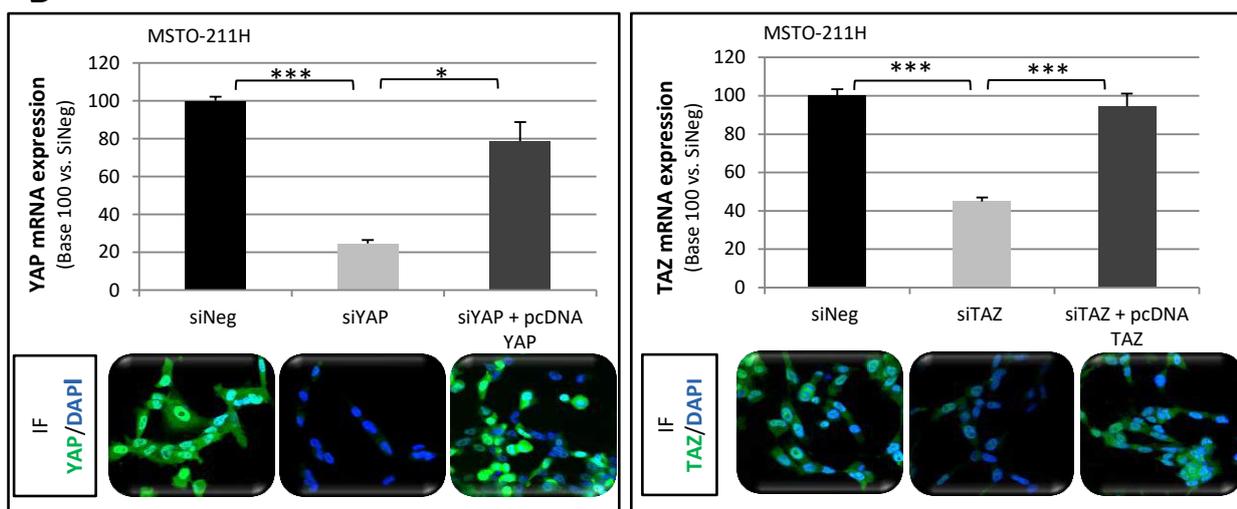
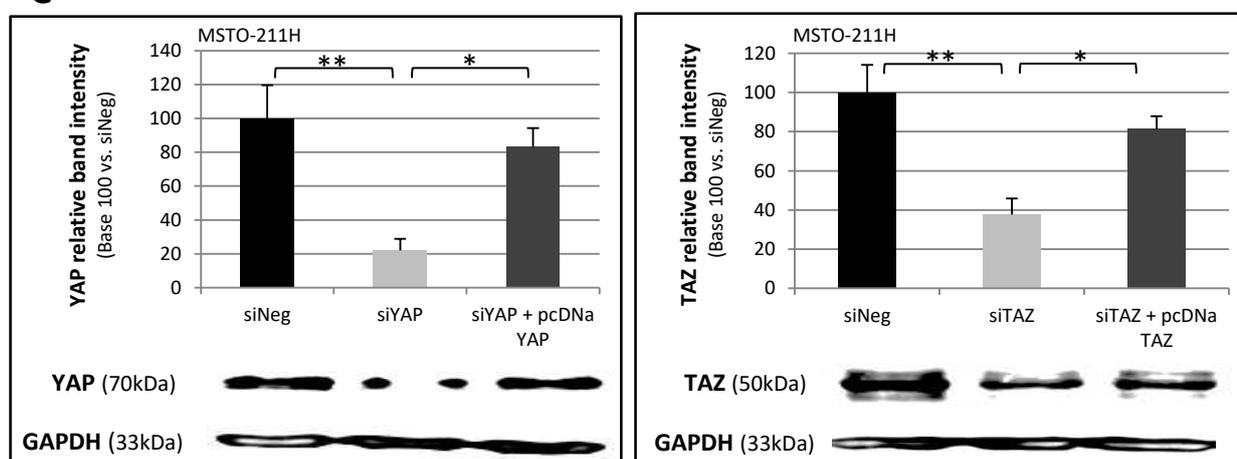
B**C**

Figure 58: Extinctions spécifique de l'expression du messager et/ou de la protéine de MST1, YAP et TAZ dans les lignées mésothéliales humaines.

Le taux d'extinction d'ARNm et/ou protéique est quantifié 48 heures après la transfection.

A) Tableau regroupant le taux d'extinction de MST1, YAP et TAZ, dans les lignées MSTO-211H, H2452, H28 et H2052. **B)** Quantification de l'ARNm par RT-qPCR et photos représentatives du niveau protéique par IF de YAP et TAZ dans les lignées MSTO-211H.

C) Quantification protéique de YAP et TAZ par WB. n=3, t-Test, * vs. condition siNeg ou siARN + pcDNA3: *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001.

I.C. L'inactivation de MST1 favorise l'invasion, la croissance sans adhésion, la prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules mésothéliales tumorales

I.C.1. Mises au point des extinctions/réexpressions

Nous avons au préalable déterminé les concentrations adéquates en siARN et plasmide pour induire la perte d'expression de nos différentes cibles dans quatre lignées cellulaires mésothéliales exprimant nativement MST1 (MSTO-211H, H2452, H28 et H2052).

Les extinctions ont été réalisées en transfectant ces cellules par un siARN (anti-MST1, anti-YAP ou anti-TAZ) avec le kit JetPIMETM (Ozyme®). En parallèle, nous avons effectué une transfection de siARN « Négatif », servant de contrôle de transfection, afin de s'assurer que les effets observés ne sont imputables qu'à l'extinction du gène souhaité. La spécificité des effets de la perte d'expression de nos cibles a été testée en ré-introduisant leur expression au moyen d'un plasmide (pcDNA) « si-résistants » portant la séquence sauvage de MST1 ou mutée pour YAP et TAZ (mutation S127A et S89A respectivement empêchant la phosphorylation et donc l'inactivation de YAP et TAZ par les kinases NDR).

A 48h post-transfection, les ARNs ont été extraits et amplifiés par RT-qPCR et/ou les protéines quantifiées par WB et/ou IF.

Nous avons ainsi établi dans nos modèles cellulaires, qu'une concentration de 40 nM de siMST1 et 25 nM de siYAP ou siTAZ permettaient respectivement une diminution de l'expression de 40% et 70-75% à l'échelle du messenger et/ou de la protéine (Figure 58). L'extinction de MST1 est illustrée dans l'article 1 ([paragraphe suivant de ce manuscrit](#)).

I.C.2. L'inactivation de MST1 prédit un moins bon pronostic chez les patients atteints de MPM car entraîne l'invasion, la croissance sans adhésion, la prolifération et une diminution de l'apoptose des cellules mésothéliales tumorales

Article 1 (en préparation pour Clinical cancer research)**MST1 promoter methylation predicts worse survival in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM) in IFCT-0701 MAPS trial.**

Elodie Maille^{1,2}, Solenn Brosseau³, Vincent Hanoux⁴, Christian Creveuil⁵, Claire Danel⁶, Emmanuel Bergot^{2,7}, cliniciens du protocole MAPS, Alexandra Langlais⁹, Franck Morin⁹, Guénaëlle Levallet^{2, 8#}, Gérard Zalcman^{3#*}

¹ Normandie Univ, UNICAEN, INSERM UMR 1086 ANTICIPE, 14000 Caen, France

² Normandie Univ, UNICAEN, CEA, CNRS, ISTCT/CERVOxy group, 14000 Caen, France, GIP CYCERON

³ Service d'Oncologie Thoracique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Université Paris-Diderot 75018 Paris, France

⁴ Normandie Univ, UNICAEN, UPRESEA2608, 14000 Caen, France

⁵ Unité de recherche biomédicale, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14000 Caen, France

⁶ Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, AP-HP, Université Paris-Diderot 75018 Paris, France

⁷ Service de Pneumologie, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14000 Caen, France

⁸ Service d'Anatomie pathologique, CHU de Caen, Avenue de la Côte de Nacre, 14000 Caen, France

⁹ Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique (IFCT), 10 rue de la Grange Batelière, 75010 Paris, France

both senior authors contributed equally

***Correspondence author (to whom reprints may be requested):**

Address for correspondence: Pr. Gérard Zalcman, Service d'Oncologie thoracique, Hôpital Bichat-Claude Bernard, 75018 Paris, France. Tel.: + 33 (0)1 40 25 75 02.

Email: gerard.zalcman@aphp.fr

Running title: MST1 loss predict shorter survival in patient with MPM.

Keywords: malignant pleural mesothelioma, promotor hypermethylation, MST1, biomarker.

ABSTRACT

Purpose: The Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS, NCT00651456) phase 3 trial demonstrated the benefic of Bevacizumab combination with the Pemetrexed-Cisplatin doublet, over chemotherapy alone, in 448 patients with MPM. Backed to this trial, a biological study (Bio-MAPS) evaluated the prognostic role of the RASSF/Hippo member promoter methylation.

Experimental design: Promoters methylation was assayed by MS-PCR in samples from 223 MAPS patients and their prognostic value evaluated for overall and disease-free survival, in univariate and multivariate analyses. MST1 inactivation effects on invasion, soft agar growth, apoptosis, proliferation and YAP/TAZ accumulation were investigated using siRNA in human mesothelial cell lines.

Results: Only *STK4* (MST1) gene promoter was detected hypermethylated in 19 of 223 patients tested (8.5%), predicting poorer overall survival in univariate (HR 2.40, 95%CI [1.48; 3.90], $p < 0.001$) as multivariate analysis (Adj HR 1.78, 95%CI [1.09; 2.93], $p = 0.022$, adjustment for sex, age, histology sub-type, performance status, haemoglobin, leukocytes and platelets counts, smoking and treatment arm). A computed internal validation procedure was performed by bootstrap resampling further supporting this prognostic impact. *In cell*, MST1 inactivation significantly reduces basal apoptotic activity while increasing proliferation, invasion through Matrigel® and growth without anchorage (soft agar or in suspension), resulting in nuclear YAP accumulation but TAZ cytoplasmic retention in mesothelial cells lines. By silencing YAP, we achieved to decreases invasion of MST1-depleted mesothelial cells lines.

Conclusions: MST1 kinase loss of expression is a poor prognostic factor in patients with MPM, leading to nuclear YAP accumulation and electing YAP as targets for therapeutic intervention in human MPM.

Translational Relevance

Hippo pathway alterations have been described in malignant pleural mesothelioma (MPM). However, the hippo cascade contribution to prognosis in human MPM remains largely unknown. In a prospective phase III trial evaluating the contribution of bevacizumab plus chemotherapy on overall survival, we established and validated by a bootstrap methodology that MST1 (hippo) promoter methylation negatively impacted overall survival in a subset of 8.5% of MPM patients. We further showed that MST1 inactivation by siRNA increased cytoplasmic extension numbers and led to stretching appearance of human mesothelial cell lines. MST1 loss also favored invasion and soft agar growth, increased basal proliferation of MPM cells but decreased basal apoptosis. Finally MST1 loss led to nuclear YAP accumulation but TAZ cytoplasmic retention. Collectively, our results indicate that YAP represents attractive targets for new therapeutic intervention in human MPM, by regulating actual features of MPM aggressiveness and resulting in unsatisfactory survival.

INTRODUCTION

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare but aggressive cancer with poor prognosis mainly caused by asbestos fibers exposure (1). Recently, the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS) demonstrated the benefice of bevacizumab association with cisplatin/pemetrexed doublet on both overall (OS) and disease-free survival (DFS) in 448 patients with MPM (2). Backed to this trial, a biological study (Bio-MAPS) now evaluates new MPM biomarkers including the Hippo Mammalian Sterile 20-like Kinase (MST1), MPM being characterized by frequent Hippo pathway alteration (3).

Mammalian Sterile 20-like Kinase (MST1, also named STK4) and MST2 (STK3) are the best characterized of the 5 MST kinases (MST1/2/3/4 and YSK1) existing in mammals. MST1/2 function is primarily to activate/phosphorylate the Large tumor suppressor homolog 1/2 (LATS1/2) kinases and thus regulate 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 lead to transcription of genes 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 also contribute to the regulation of i) apoptosis by establishing a complex with RASSF1A and CNK1 protein (6,7) or with the apoptosis inhibiting protein kinase CK2 (8), ii) cell cycle progression by catalyzing the mitotic phosphorylation of MOBKL1A/1B (9–13), iii) migration/invasion processes by stabilizing lamellopodial F-actin (14–16).

Several studies suggest that dysregulation of the Hippo signaling pathway is involved in pleural carcinogenesis, as for example, the work by Bueno and collaborators (3), however MST1 inactivation has never been demonstrated in MPM. Here, we firstly established a correlation between the MST1 gene promoter hypermethylation and a shorter OS in patients with MPM. By transfecting cells with siARN-MST1, we further reported that MST1 inactivation increases proliferation, invasion, cells colonies formation of MPM cells line while decreases their basal apoptotic activity. We finally demonstrated that the loss of MST1 expression effects depends on inappropriate activation of YAP.

Table S1. MS-PCR primers sequences.

Séquence (5'→3')		T _M	Size (bp)	References
LATS1 (Genbank access : NW_001838990.2)				
U:	F: TGAATGATTAGAGTTGTGGGTGATGT R: AACATTTCCCAACATCACTTACACA	60°C	128	Seidel et al., 2007
M:	F: GAACGATTAGAGTTGCGGGCGAC R: AACATTTCCCGACGTCGCTTACG	62°C	126	
LAST2 (Genbank access : 26524)				
U:	F: GGTGTTTTGTTGGATTGGTATGTGGTT R: CATCTCCCAAAACACTCACACCACA	60 °C	141	Seidel et al., 2007
M:	F: TTCGTTCCGATTGGTATGCGGTC R: CCATCTCCCGAAACGCTCACG		137	
MST1 (Genbank access : NW_001838666.1)				
U:	F: TTTGTGGGGTGGGTTTAGGAGGTTTGT R: AACCAATAACCCCTCACCAACACAACAA	63°C	125	Seidel et al., 2007
M:	F: GCGGGGCGGGTTTAGGAGGTTTC R: CCAATAACCCCTCACCGACGC		120	
MST2 (Genbank access : NT_008046.15)				
U:	F: TTTTAAGTGGGAGGGAGATTTGTTGTGG R: AAAAACCACCAACCAACCAACCAAC	61°C	108	Seidel et al., 2007
M:	F: CGGGAGGGAGATTCGTCGCG R: AAACCGAAACACCGACCGACCG	63°C	99	
RASSF1A (Genbank access : NC_000003)				
U:	F: TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG R: CAAACCCACAACTAAAAACAA	60°C	108	Schagdarsurengin et al., 2002
M:	F: GTGTTAACGCGTTGCGTATC R: AACCCCGCAACTAAAAACGA	62°C	96	
RASSF2 (Genbank access : NT_011387.8)				
U:	F: AGTTTGTGTTGTTTTTAGGTGG R: AAAAACCAACAACCCACACA	63°C	108	Hesson et al., 2005
M:	F: GTTCGTCGTCGTTTTTAGGCG R: AAAAACCAACGACCCCGCG			
Nore1A/RASSF5 (Genbank access : NC_000001)				
U:	F: ATTTATATTTGTGTAGATGTTGTTGGTAT R: ACTTTAACAACAACCTTAACAACACTACA	63°C	215	Hesson et al., 2004
M:	F: CGTCGTTGGTACGGATTTATTTTTTCGGTTC R: GACAACCTTAACAACGACTTTAACGACTACG	62°C	202	

MATERIEL & METHODS

Patients from MAPS trial

From Feb 13, 2008, to Jan 5, 2014, 448 patients were randomly assigned to treatment (223 [50%] to pemetrexed plus cisplatin and bevacizumab and 225 [50%] to pemetrexed plus cisplatin). MPM diagnosis certification was performed following the histopathological international classification system (WHO 2004). Specific informed consent was obtained for biological studies (Bio-MAPS) and approved by the trial's appointed ethics committee (CPP Ref 2007-20 Nord-Ouest III, France).

DNA Extraction and Methylation-Specific PCR assay (MS-PCR)

DNA samples from MPM were obtained from paraffin-embedded tumor using QIAmp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen) and genomic DNA bisulfite modification performed using the Epiect kit (Qiagen) according the manufacturer's recommendation and as previously detailed (17). PCR was conducted with primers specific for either the methylated or unmethylated alleles ([TableS1](#)) in standard conditions for the following genes encoding for proteins of the Hippo pathway or the RASSF superfamily: RASSF1A, RASSF2A, RASSF5, RASSF10, MST1, MST2, LATS1, LATS2, RASSF6 methylation status was determined by COBRA technique as previously described (18).

TableS2. siRNA and plasmids used in this work.

	siRNA sequences	Plasmide (Addgene reference)
MST1	si1 : GCGGAGCCAAUACUAUGAU	#12203
	si2 : GCGGAGCCAAUACUAUGAU	
YAP	si1 : UGAGAACAAUGACGACCAA	#27370
	si2 : CCACCAAGCUAGAUAAAGA	
TAZ	si1 : AGGTACTTCCTCAATCACA	#32840
	si2 : CUAGGAAGGCGAUGAAUCA	

TableS3. Primers used in this work for qRT-PCR.

	Forward (5'- 3')	Reverse (5'-3')
MST1	GTAGCCAGCACCATGACTGA	TTGCCAAAGCTGTTGATCTG
YAP	GCCGGAGCCCAAATCC	GCAGAGAAGCTGGAGAGGAATG
TAZ	ACCCACCCACGATGACCCCA	GCACCCTAACCCAGGCCAC
CTGF	AGGAGTGGGTGTGTGACGA	CCAGGCAGTTGGCTCTAATC
AREG	TGCTGGATTGGACCTCAATG	TCCCGAGGACGGTTCACTAC
ANKDR1	AGTAGAGGAACTGGTCACTGG	TGGGCTAGAAGTGTCTTCAGAT

Cell culture and transfection

Human MPM cell lines MSTO-211H, NCI-H2452, NCI-H28 and NCI-H2452 from American Tissue Culture Collection (ATCC) were maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS, 10mM L-Glutamine and Streptavidin/Penicillin, Kanamycin (100µg/ml). Cells were transfected using JetPRIME (Polyplus®) with siARN and/or plasmid DNA listed [TableS2](#).

Reverse Transcription-Quantitative real-time-PCR (RT-qPCR).

After RNA extraction, RT-qPCR was done with primer sets ([TableS3](#)) as described previously (19). RT-qPCR data were normalized to the human GAPDH. Relative quantification was calculated using the delta-delta-Ct method.

Immunoblotting

Whole cell protein extracts were prepared as previously described (20), and proteins detected by immunoblotting with primary antibody from Cell signaling (E-Cadherin, MST1, YAP/TAZ, P-Ser127YAP, GAPDH, Vimentin) diluted at 1:1000 in Tween (0.1%)-TBS buffer and HRP-conjugated secondary antibody and revealed by enhanced chemiluminescence with ECL kit (Promega™). Densitometry results of western blot were analyzed with Image J software. Signal intensity of each band was normalized with GAPDH densitometry values.

Immunofluorescence and image analysis

Transfected cells were fixed and permeabilized as described previously (20). Primary antibodies were YAP (cell signaling, 1/150), TAZ (cell signaling, 1/150), alpha-tubulin (SigmaAldrich, 1/300), Actin (Cell signaling, 1/300) or cytochrome C (BD Biosciences, 1/50).

The AlexaFluo633, AlexaFluo555 or 488-labelled (Invitrogen™) secondary antibodies was added for 1h. Coverslips were mounted with DAPI (Santa Cruz™), and image captured with high-throughput confocal microscopy (FluoView FV1000, Olympus™).

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 pore size (BD BioCoat Matrigel® Invasion Chamber, BD Biosciences™). Complete media supplemented with HGF were added to the bottom chambers. Cells were incubated 48h and removed, migrating (bottom) cells were stained with crystal violet.

Soft-agar assay

Base agar matrix (100 μl , Cell Biolabs) was seeded in 96-well plate and 1,500 cells/well layered on agar followed by 50 μl of 2x complete medium. Colonies were stained and counted for each well 25 days later.

Spheroid culture

At 24h post-transfection, cells are reseeded with complete medium, in 24-well plates without adhesion (Nunclon™ Sphera™ Microplates, Thermo Fisher Scientific). Spheres formation is evaluated on the 6th day at x10 magnification with a phase contrast inverted microscope.

Apoptosis measurement

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

Bromodeoxyuridine (BrdU) Incorporation

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

AREG measurement

Amphiregulin release in cell culture supernates was quantified using the Amphiregulin Quantikine ELISA Kit (R&D system) according manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

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

Prognosis value of MST1 promotor hypermethylation was assessed for DFS and OS using univariate and multivariate Cox models. Cofactors introduced in the multivariate model were: treatment arm, stratification factors used in the MAPS trial (histology, PS and smoking status) and clinical factors known to be associated to survival (sex, age, haemoglobin, white blood cells and platelets).

Table S4. Baseline characteristics of the 223 patients with available MSP-PCR for MST1.

		N	n (%) or mean (\pm SD) or median	
Sex	Male	223	171	(76.7%)
	Female		52	(23.3%)
Age		223	66.8	(61.9 - 70.2)
Haemoglobin		223	13.2	(\pm 1.7)
leucocytes		223	8.0	(6.7-9.6)
Neutrophils		223	5.4	(4.4-6.9)
Platelets		223	318	(263.0 - 400.0)
Treatment Arm*	PC	223	108	(48.4%)
	PCB		115	(51.6%)
Histology	Epithelioid	223	182	(71.6%)
	Sarcomatoid		21	(9.4%)
	Biphasic		20	(9.0%)
Performans Status	0	223	112	(50.2%)
	1		103	(46.2%)
	2		8	(3.6%)
Smoking status	Never smokers	223	94	(42.2%)
	Smokers		129	(57.8%)

***Arms** : 500 mg/m² pemetrexed plus 75 mg/m² cisplatin with (PCB) or without (PC) 15 mg/kg bevacizumab in 21 day cycles for up to six cycles

Hazard Ratios (HR) were estimated with their 95% Confidence Intervals (95%CI). Bootstrap resampling was used to assess the model stability and to estimate the optimism corrected concordance index (c-index). The data were analyzed with IBM SPSS software Version 22.0.

In vitro data are means \pm SEM of experiments realized at least three times independently. Statistical differences were determined either by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's Multiple Comparison Test to compare each conditions of an experiment with siMST1 (GraphPad Software, Inc. USA). Statistical significance was set at $p\leq 0.05$.

RESULTS

MST1 promotor hypermethylation predicts shorter OS of patient with MPM

Baseline characteristics study of patients from MAPS trial reveals that biological parameters (haemoglobin, platelets count, leucocytes count), general condition (PS 0-1 versus >2), and histology (epithelioid vs. sarcomatoid/mixed) are potent prognostic factors of OS ($p<0.05$) and DFS in univariate and multivariate analyses (2) in this subset of MAPS patients. Baseline characteristic from the 223 patients for whom gene methylation assays were performed did not differ from the characteristics of the patients for whom such analyses were not possible (TableS4). RASSF1A, RASSF2A, RASSF6 and RASSF10 were found methylated in 11,1%, 14,5%, 21,5% et 4,4% of samples respectively, while no sample exhibited any RASSF5, MST2, LATS1 or LATS2 methylation. None of these methylations influence survival in univariate analysis (data not shown).

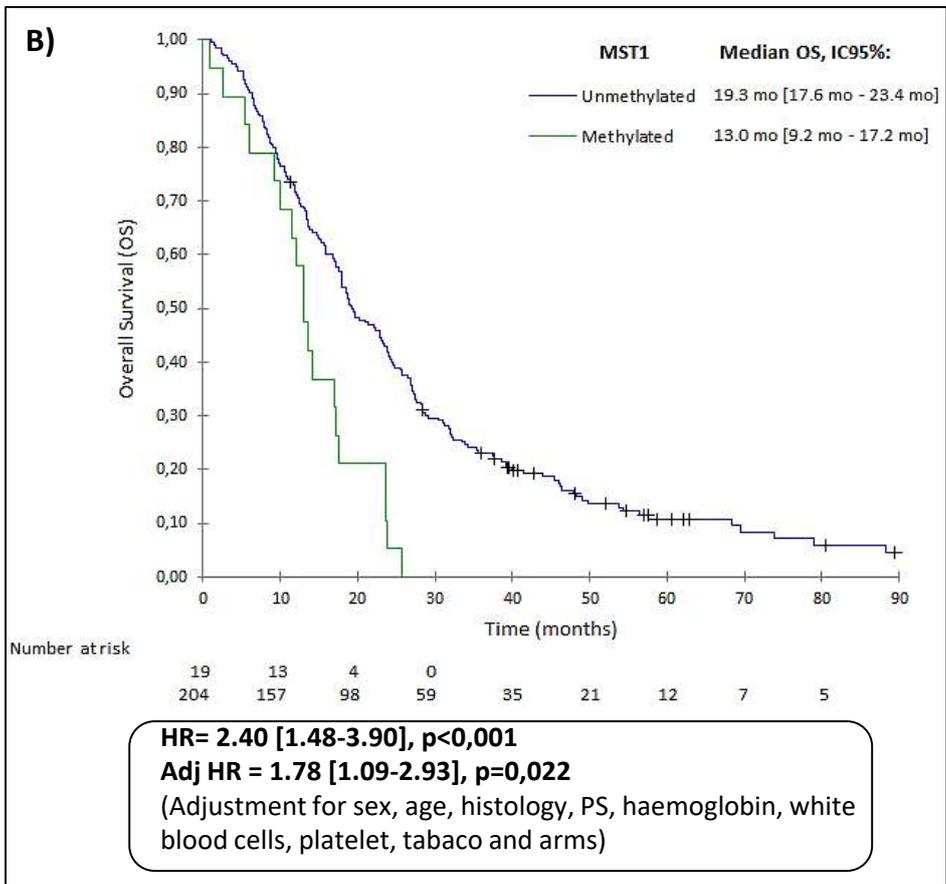
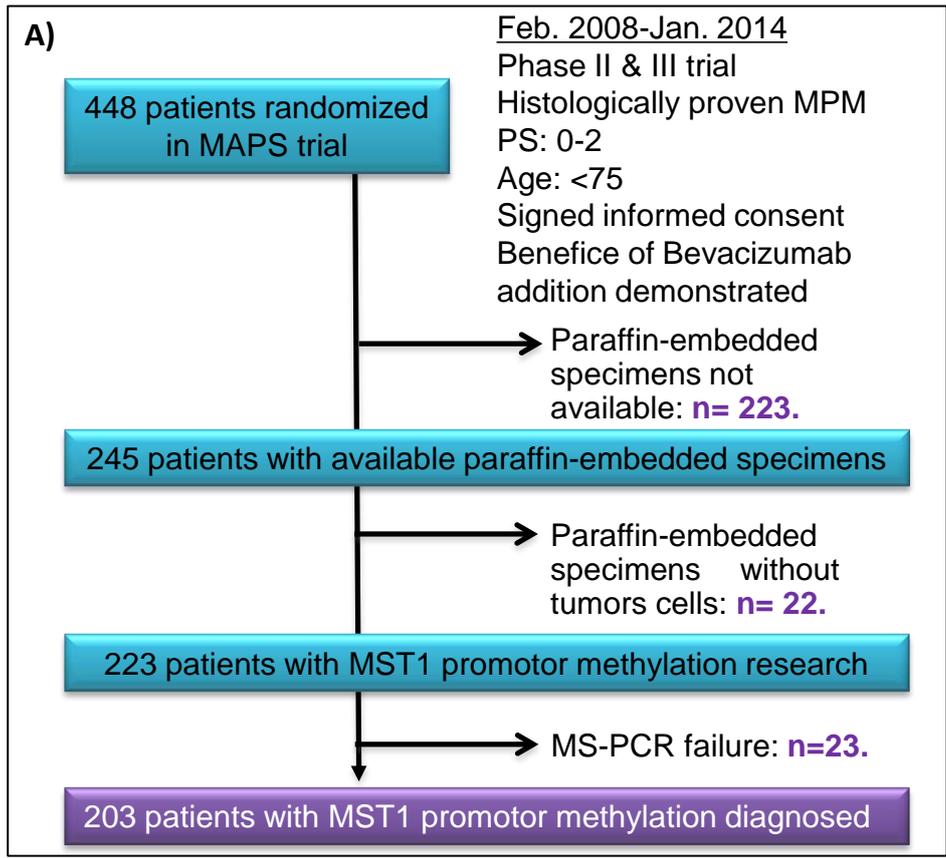


Figure 1. A) Flow chart. B) Kaplan-Meier curve of Overall survival according MST1 promoter status (methylated or unmethylated).

MST1 promoter methylation status was available for 223/448 patients from MAPS trial (Figure 1A), and actually MST1 promoter was methylated in 19/223 samples (8.5%).

In univariate analysis, median OS of patients with methylated MST1 promoter is 1.4-fold lower compared to median OS of patients with unmethylated MST1 promoter (13.0 *versus* 19.3 months, HR 2.40, 95%CI [1.48; 3.90], $p < 0.001$) (Figure 1B).

This result was confirmed in multivariate analysis (Adj HR 1.78, 95%CI [1.09; 2.93], $p = 0.022$, adjustment for gender, age, histology, PS, haemoglobin, leucocytes and platelet counts, smoking and treatment arm), and validated by a bootstrap procedure: MST1 methylation was significantly associated to worse OS in 59% of 1000 bootstrapped samples, with an optimism corrected c-index of 0.67.

However, MST1 inactivation did not significantly predict DFS of patients with MPM (HR=1.53, 95%CI [0.95; 2.46], $p = 0.082$ in univariate analysis, HR=1.07, 95%CI [0.65; 1.76], $p = 0.79$, as in multivariate analysis).

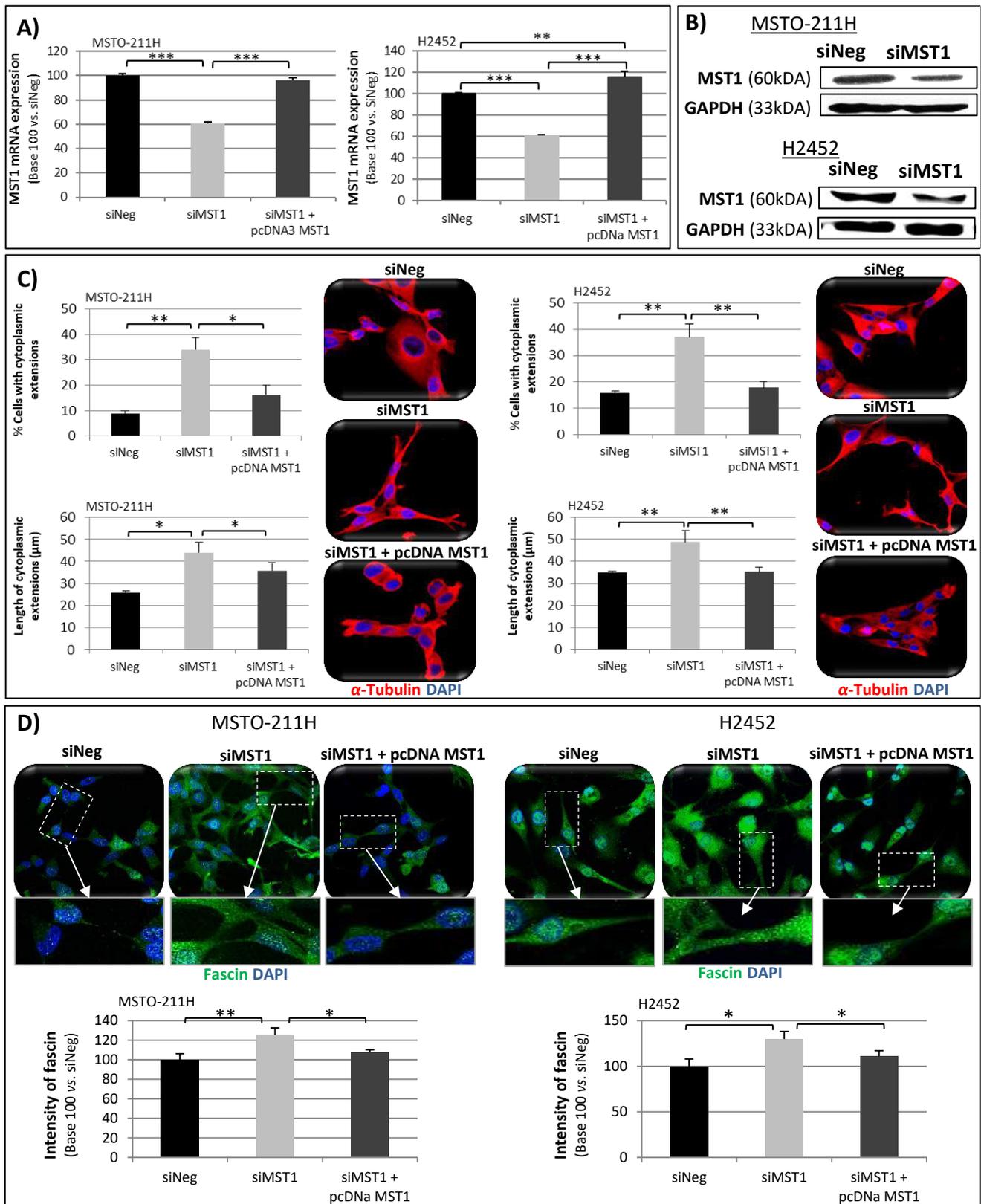


Figure 2. MST1 depletion causes morphologic changes.

(A-D). MSTO-211H and H2452 cells transfected with siNeg, siMST1 or siMST1+pcDNAMST1, the experiments were performed 48h hours after transfection. Expression of MST1 was analyzed by RT-qPCR (A) and western blot (B), using GAPDH as an internal control. Quantification of number cytoplasmic extensions and their size (µm) after α-Tubulin staining (C) and quantification of Fascin expression (D), by immunofluorescence and confocal microscopy. Representative confocal picture (C-D) are showed from cells stained for α-Tubulin (red), Fascin (green), nuclei stained with DAPI. For all of the histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001, using an ANOVA test followed by Dunnett's test.

MST1 depletion modifies human mesothelial cells stretching

Since MST1 methylation status was the only alteration found to significantly influence prognosis in our large series of MPM patients, we focused our functional mesothelial cell studies on the role of MST1.

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 siRNA sequences, we retained two siRNA decreasing both MST1 mRNA and protein expression by at least 40% in MPM cells (Figure 2A, 2B, Figure S1A).

As evidenced by alpha-tubulin immunostaining, MST1 depleted cells are much more “stretched” than cells transfected with a control siRNA (siNeg): area of MSTO-211H or H2452 cells (Figure 2C) (as H2052 and H28, data not shown) is significantly increased and cells exhibit more cytoplasmic extensions. Epithelial (E-cadherin) and mesenchymal (Vimentin) markers quantification demonstrate that the morphological changes induced by MST1 loss are not sustained by an epithelial-mesenchymal transition since we did not find any 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 (Figure 2D), thus suggesting an increased ability for cell migration, upon MST1 knock-down.

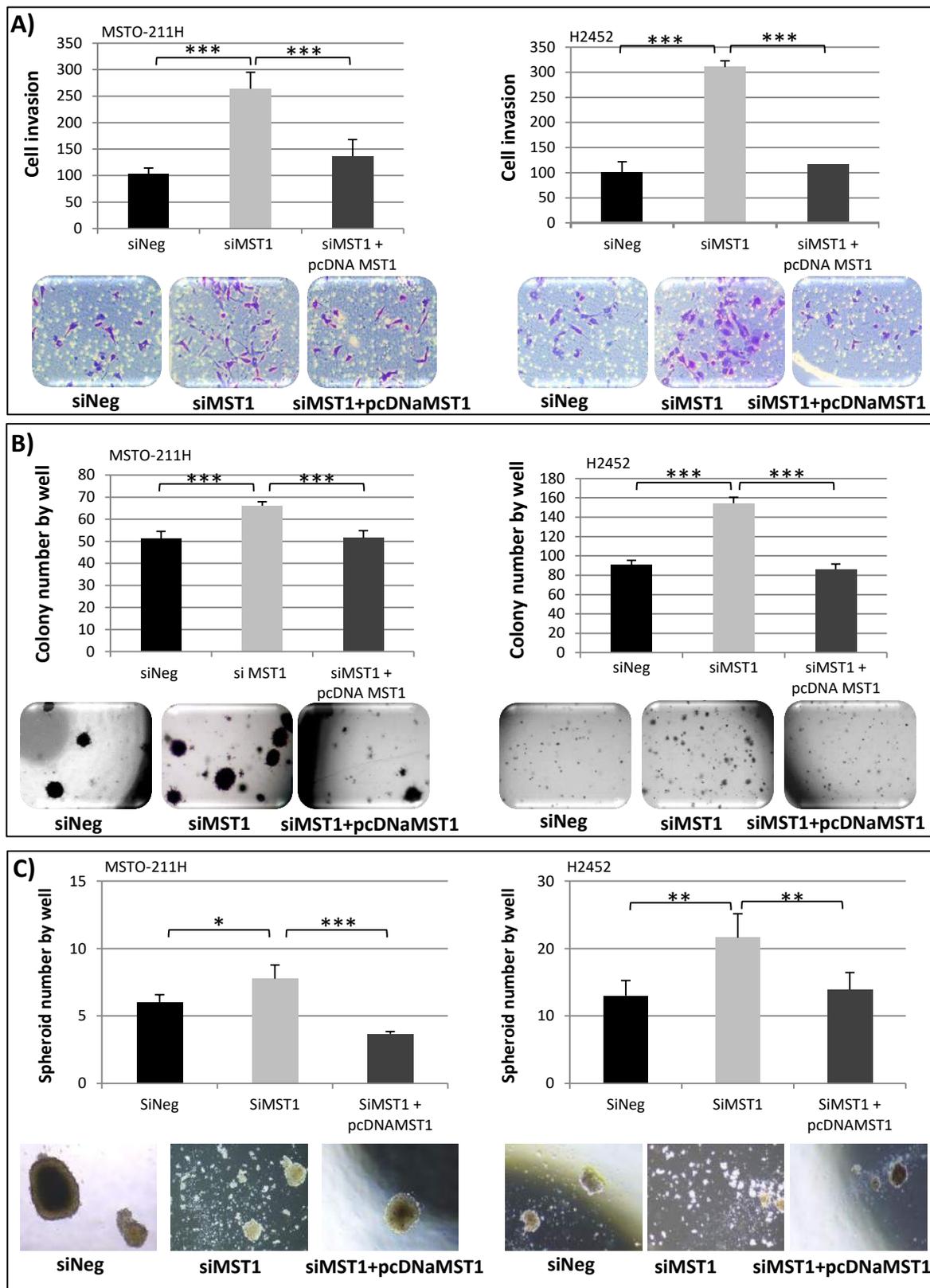


Figure 3. MST1 depletion increase cell invasion, anchorage-independent growth and spheroid number.

(A-C) MSTO-211H and H2452 cells transfected with siNeg, siMST1 or siMST1+pcDNAMST1, the experiments were performed 48h hours after transfection. **A)** Invasion capacity of transfected cells on BioCoat Matrigel Invasion Chamber for 48h. **B)** Quantification of colony in soft agar after 21 days. **C)** Quantification spheroid number after 6 days. Representative picture is shown under histograms. For all of the histograms, error bars indicate the SEM of at least four independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, using an ANOVA test followed by Dunnett's test.

MST1 loss increases invasion and growth in agar of MPM cells

We observed that MST1 depletion significantly increases the ability of MSTO-211H, H2452 ([Figure3A](#)), H28 and H2052 ([FigureS1B](#)) cells to invade Matrigel®. Moreover, colony formation on soft agar was increased by MST1 depletion in MSTO-211H, H2452 ([Figure3B](#)) and H28 and H2052 ([FigureS1C](#)).

Finally, by impeding substrate cell attachment, we found an increase of spheroid formation in MSTO-211H and H2452 cells in absence of the MST1 kinase ([Figure3C](#)). For MST1 depleted MSTO-211H cells, we further observed that cells are more individualized than control cells which necessarily group into cell clumps.

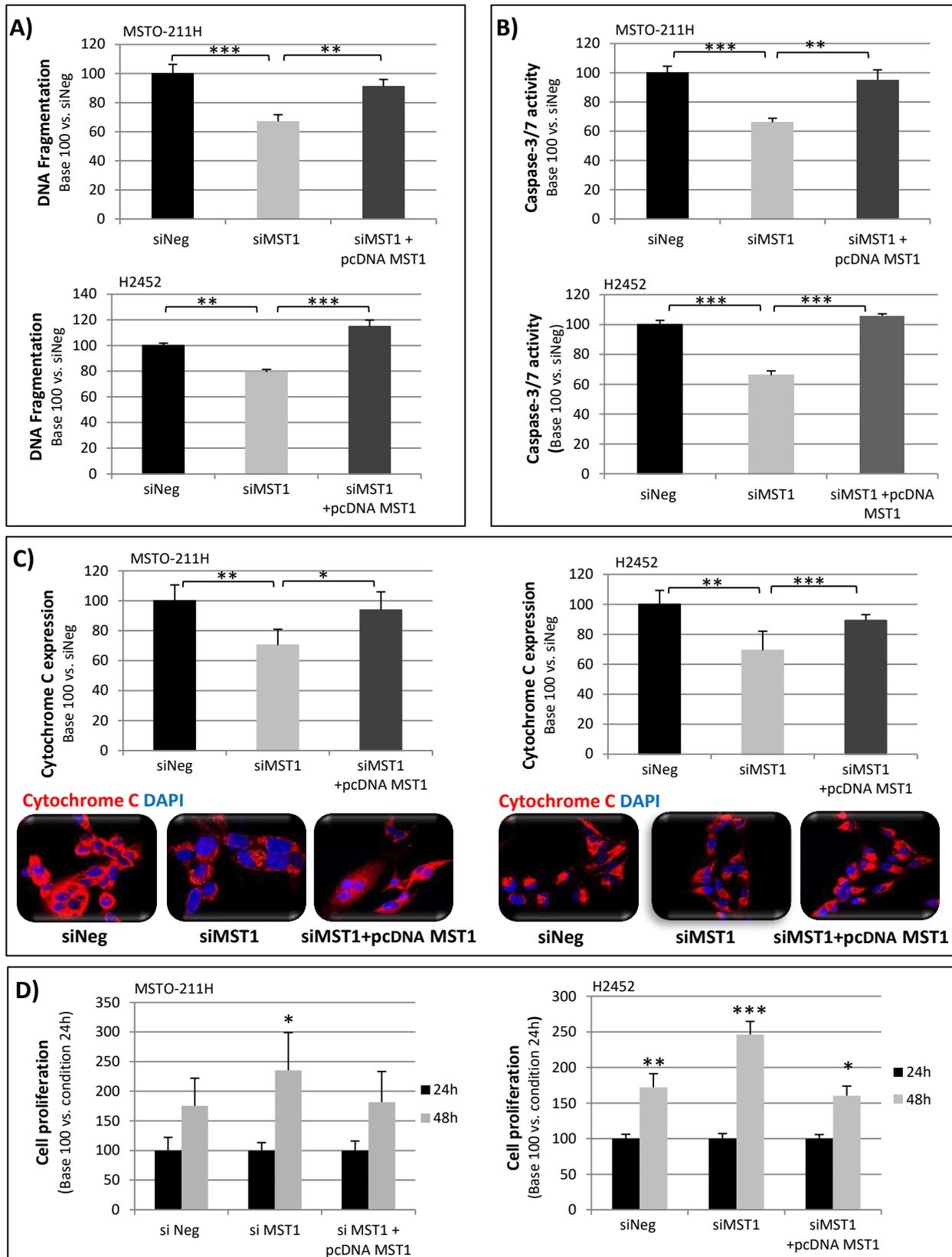


Figure 4. MST1 depletion decreases apoptosis and increases cell proliferation.

(A-D) MSTO-211H and H2452 cells were transfected with siNeg, siMST1 or siMST1+pcDNAMST1. Experiments performed 48h hours after transfection. **A)** DNA Fragmentation. **B)** Caspase 3/7 activity. **C)** Quantification of cytochrome c (red) and representative immunofluorescent confocal picture, nuclei stained with DAPI. **D)** Cell proliferation assays. For all of the histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, using an ANOVA test followed by Dunnett's test.

MST1 depletion decreases basal apoptosis and increase proliferation of MPM cells

MSTO-211H and H2452 cells lines transfected with siMST1 present a significant reduction in DNA fragmentation ([Figure4A](#)) suggesting a decrease of apoptosis. This result is consistent with a decrease caspase 3/7 activity also measured in absence of MST1 in MSTO-211H and H2452 cells ([Figure4B](#)) as in H28 and H2052 cells ([FigureS1D](#)), and the lower intensity of cytochrome C staining quantified in MSTO-211H and H2452 cells ([Figure4C](#)), all these assays exploring apoptosis ability.

This basal apoptotic activity decrease in MST1-depleted cells is accompanied by cell proliferation increase for MSTO-211H and H2452 cells ([Figure4D](#)), H28 and H2052 cells ([FigureS1E](#)), as measured by BrDU incorporation.

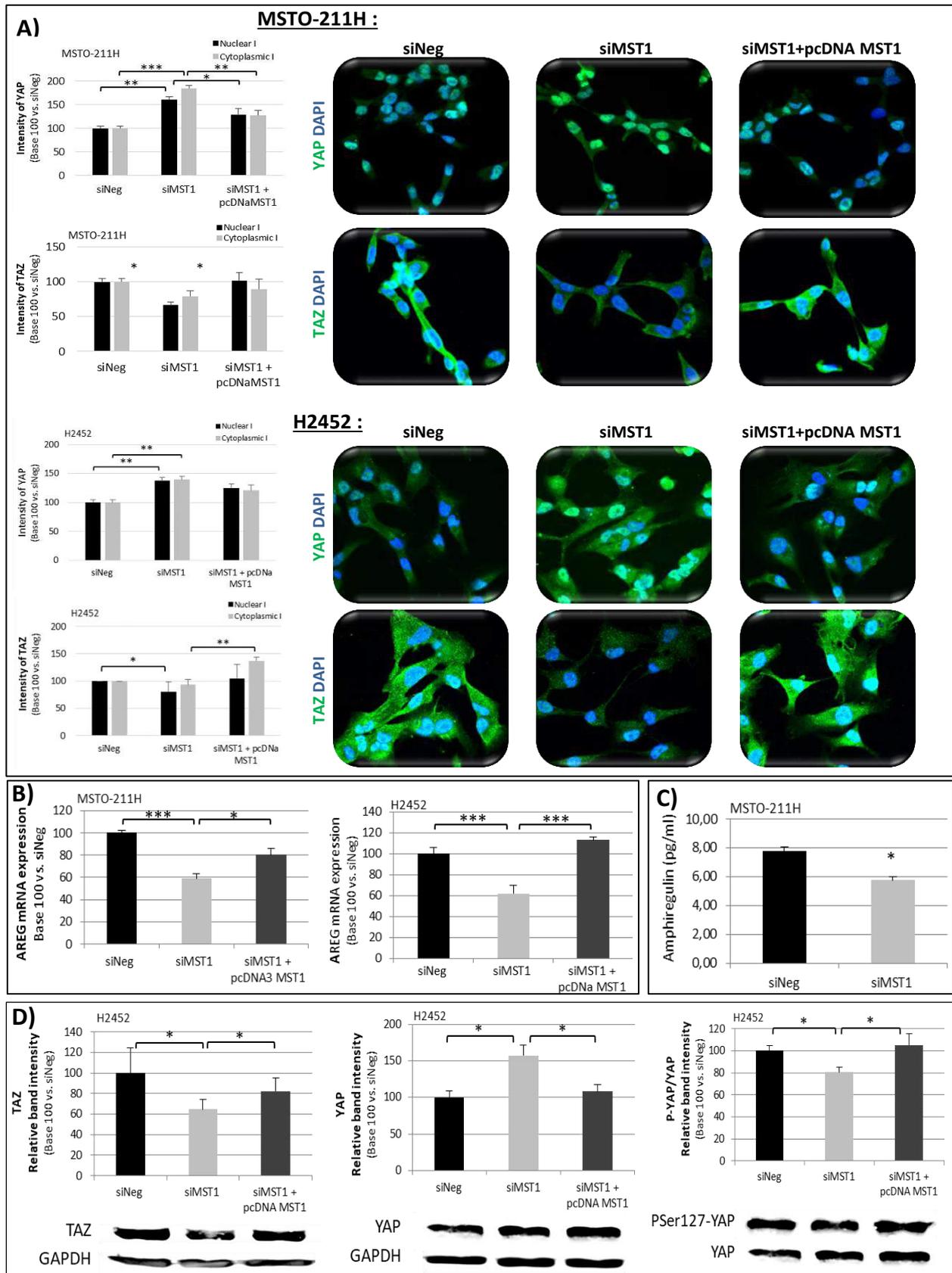


Figure 5. MST1 depletion increases YAP nuclear but decreases TAZ nuclear.

(A-D) MSTO-211H and H2452 cells were transfected with siNeg, siMST1 or siMST1+pcDNAMST1. Experiments performed 48h hours after transfection. **A)** YAP nuclear and cytoplasmic localization assayed by immunofluorescence. **B)** YAP/TAZ activity by quantifying Amphiregulin (AREG) expression. **C)** Quantification of Amphiregulin by quantikine Elisa. **D)** Quantification of TAZ, YAP and PS127-YAP protein levels using GAPDH as internal control. For all of the histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, using an ANOVA test followed by Dunnett's test.

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 proteasom degradation (4). Actually, by using immunocytochemistry, we found that MST1 depletion leads to nuclear YAP accumulation, suggesting a decrease in YAP phosphorylation. Conversely, using specific TAZ antibodies, we found a decrease of nuclear TAZ, a YAP close homolog, in MSTO-211H as in H2452 mesothelial cells (Figure5A).

We evaluate YAP/TAZ transcriptional activity by quantifying expression of YAP/TAZ target genes: *CTGF*, *ANKDR1*, *AREG*. Despite the increase of nuclear YAP in MST1-depleted cells, *CTGF* or *ANKDR1* expression did not significantly vary upon MST1 depletion (data not shown), while *AREG* expression decreases by 2-fold (Figure5B), being probably the reflect of the TAZ decrease since *AREG* has been shown to be regulated by TAZ rather than by YAP (21). In line with such data, by quantifying *AREG* released in culture media with an ELISA assay, we measured that *AREG* concentration decreased by two times in the media from cells depleted for MST1 as compared with the media of cells normally expressing MST1 (Figure5C).

Western blot analyze further confirms that YAP protein is more expressed while TAZ protein is less expressed in MST1-depleted MPM cells lines. 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 (Figure5D).

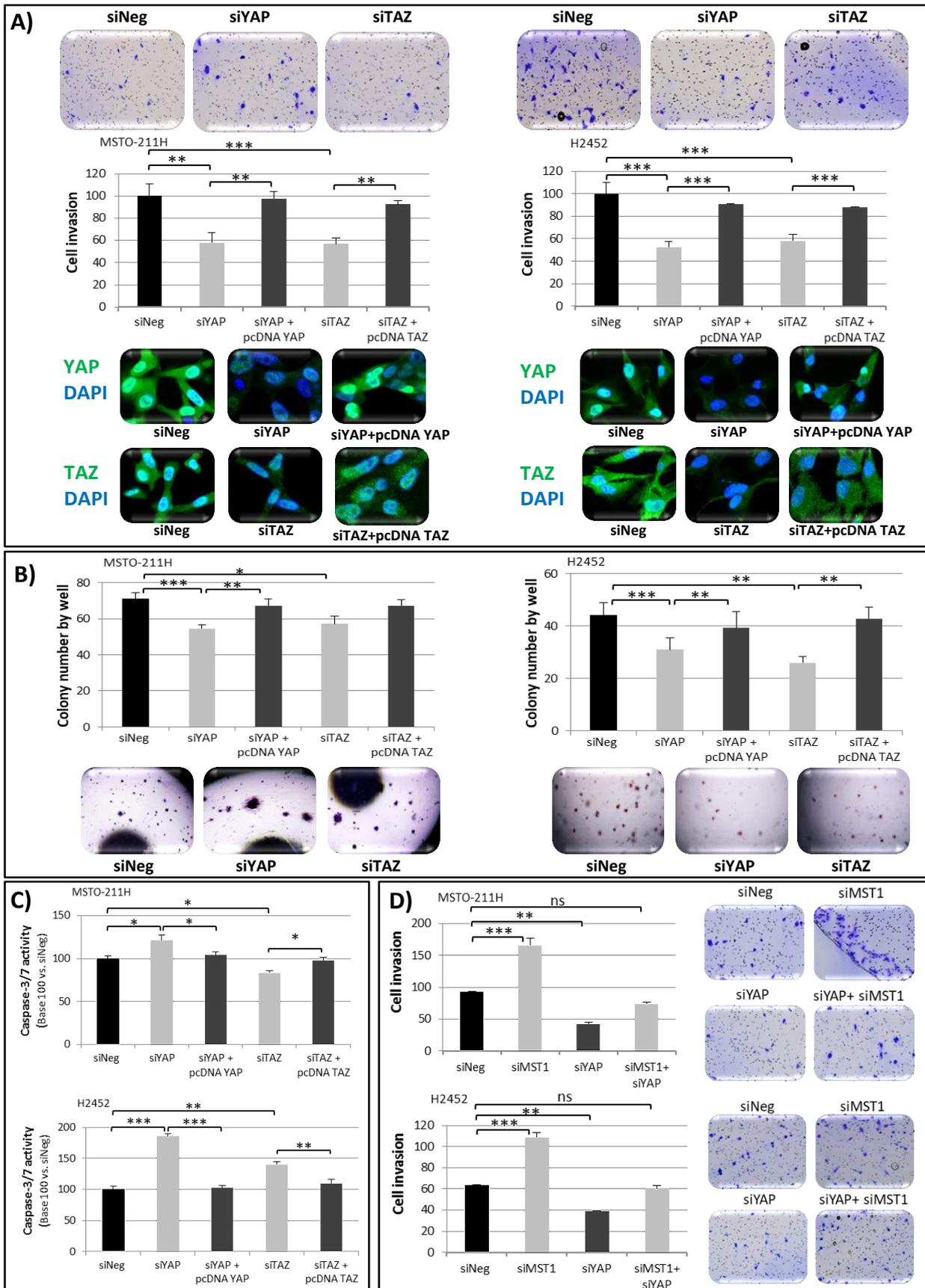


Figure 6. YAP or TAZ depletion decreases cell invasion, anchorage-independent growth while increase apoptosis. (A-C) MSTO-211H and H2452 cells were transfected with siNeg, siYAP, siTAZ in combination or not with pcDNA YAP or TAZ. **A)** Invasion capacity of transfected cells on BioCoat Matrigel Invasion Chamber and representative image of the extinction of YAP and TAZ is shown under the histograms. **B)** Quantification of colony in soft agar after 21 days. Representative picture is shown above **(A)** or under **(B)** histograms. **C)** Caspase 3/7 activity. **D)** Invasion capacity of transfected cells on BioCoat Matrigel Invasion Chamber for 48h. For all of histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$, using an ANOVA test followed by Dunnett's test.

We next evaluated apoptosis activity, invasion and colony formation of MPM cell lines in the absence of either YAP or TAZ (Figure6, FigureS2). We found that YAP as TAZ extinction actually decreased MPM cell invasion (Figure6A, FigureS2A) and colony number (Figure6B, FigureS2B) and increased Caspase 3/7 activity (Figure6C, FigureS2C). Thus, aggressive cell phenotype induced by MST1 loss could be the consequence of YAP cytoplasmic to nuclear shuttle and TAZ cytoplasmic retention. By silencing YAP in MST1-depleted MSTO-211H or H2452 cells, we finally achieved to decrease their invasion through Matrigel® (Figure6D).

DISCUSSION

Nowadays there is still no oncogenic "driver" identified in the MPM allowing to develop targeted therapeutics (22). To identify such putative driver, the Bio-MAPS study characterized the molecular abnormalities in patients enrolled in the MAPS trial. Focusing on Hippo pathway alteration, we assayed MST1 gene promoter hypermethylation, for the first time to our best knowledge, in a subset (8.5%) of patients with MPM. MST1 promotor hypermethylation has been however previously described in other cancer diseases such as sarcoma (18), squamous cell carcinomas of head and neck (23), but also in non-cancer diseases such as autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis (24). While MST1 inactivation was not previously evidenced in MPM, our report is in line with the frequent genetic alterations of Hippo pathway members recently reported in MPM (3,25) and supports that Hippo pathway alterations are key events in pleural carcinogenesis (25–27).

Interestingly, our study further reveals that the hypermethylation of MST1 promotor is associated with a worse OS of patients with MPM, which is consistent with its tumor suppressor function and its potential biomarker status.

Our findings are consistent with those already reported in the literature for others cancers such as breast cancer (28), hepatocellular carcinoma (29) and colorectal cancer (30).

By mimicking the loss of MST1 in mesothelioma cell line by si-MST1 transfection, we showed that MST1 prevented nuclear YAP accumulation while allowed TAZ cytoplasmic retention in mesothelial cells, and thus inhibit cell mobility, growth cells without anchorage, cell proliferation while controlling basal apoptosis. Such results are consistent with data from the literature, MST1 role in invasion, migration, apoptosis and cell proliferation already being documented in various cancer models (15,16,31–34). Moreover, MST1 or MST2 loss is known to lead to hyperproliferation and tumorigenesis that are commonly prevented by concomitant YAP inactivation (5). Conversely, MST1 overexpression induces apoptosis, inhibits proliferation and tumor growth and leads to YAP phosphorylation on ser127 (and thus YAP inactivation) and subsequent CTGF, AREG and Survivin expression downregulation in hepatocellular carcinoma (35), as in non-small cell lung cancer (36).

Here, despite nuclear YAP accumulation consistent with a P-ser127YAP decrease in MST1-depleted cells surprisingly, we failed to measure increase of CTGF, ANKDR1 or AREG gene transcription and thus to demonstrate that YAP is accumulated under its active form. We conversely observed a decrease in the expression of AREG maybe link to TAZ decrease observed in MST1-depleted cells, AREG transcription being more under the control of TAZ than YAP (21). YAP controls the expression of a multitude of genes, it is possible that in the MST1-depleted cells, YAP promotes the expression of a non-conventional target similar to what is described in Large B-Cell Lymphoma revealing that the oncogenic action of YAP

involves the expression of IGF1R (37). We can also hypothesize that the oncogenic action of YAP is not related to its transcriptional activity but depends on its delocalization of the cell membrane since YAP participates in the control of the dynamics of adherent junctions (38) and tight (39), in its absence, such junctions may be disrupting (38) and in favor of tumor cells transformation (40).

Although we have not clearly resolved how YAP induces the more aggressive phenotype of MST1-depleted cells, we reported that YAP inactivation in MST1-depleted cells reversed their ability to invade Matrigel. The increase in YAP nuclear in the absence of MST1 could explain the worst OS in patients with MPM and at the cellular level the more "aggressive" phenotype of mesothelial cells. That loss of expression of MST1 involves YAP has been already reported in the literature (33) as the involvement of YAP in the tumor progression of MPM, but here it is the first work to identify in MPM with Hippo kinase inactivation leads to YAP misregulation.

YAP is finally evidenced as a potential therapeutic target in patients with MPM (22,41,42). In line with our results and the therapeutic potential of YAP inhibition, it was indeed previously established that YAP silencing by siRNA inhibited the growth of mesothelial cells MSTO-211H and H2052 (25) and significantly suppressed Hippo pathway transcriptional activity in mesothelial cells, with decreased invasion, tumorsphere formation, and impaired stem cell self-renewal capacity cancerous (41).

Routinely performed MST1 methylation assay could help to identify a subset of patients with worse prognosis who could derive benefit from targeted therapies impairing YAP activity, for instance by impairing the interaction of YAP with its transcriptional partners (TEAD 1-4 proteins for example). Actually, our results, obtained in this homogeneous series of patients treated in a large phase 3 trial,

confirm that targeting YAP in patients with MPM represent a new and attractive therapeutic intervention in human malignant pleural mesothelioma, by targeting actual features of MPM aggressiveness, responsible for an unsatisfactory survival, even with a modern attractive therapy such as the one used in the experimental arm of MAPS trial, associating chemotherapy with the anti-angiogenesis drug bevacizumab.

REFERENCES

1. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse Pleural Mesothelioma and Asbestos Exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med.* 1960;17:260–71.
2. Zalcman G, Mazieres J, Margery J, Greillier L, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet.* 2016;387:1405–1414.
3. 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;48:407–16.
4. Meng Z, Moroishi T, Guan K-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 2016;30:1–17.
5. Qin F, Tian J, Zhou D, Chen L. Mst1 and Mst2 kinases: regulations and diseases. *Cell Biosci.* 2013;3:31.
6. Bitra A, Sistla S, Mariam J, Malvi H, Anand R. Rassf Proteins as Modulators of Mst1 Kinase Activity. *Sci Rep.* 2017;7:45020.
7. Guo C, Zhang X, Pfeifer GP. The Tumor Suppressor RASSF1A Prevents Dephosphorylation of the Mammalian STE20-like Kinases MST1 and MST2. *J Biol Chem.* 2011;286:6253–61.
8. Servas C, Kiehlmeier S, Hach J, Gross R, Götz C, Montenarh M. The mammalian STE20-like kinase 1 (MST1) is a substrate for the apoptosis inhibiting protein kinase CK2. *Cell Signal.* 2017;36:163–75.
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 CB.* 2009;19:675–81.
10. Guo C, Tommasi S, Liu L, Yee J-K, Dammann R, Pfeifer GP. RASSF1A is part of a complex similar to the Drosophila Hippo/Salvador/Lats tumor-suppressor network. *Curr Biol CB.* 2007;17:700–5.
11. Hergovich A, Kohler RS, Schmitz D, Vichalkovski A, Cornils H, Hemmings BA. The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Curr Biol CB.* 2009;19:1692–702.
12. Praskova M, Xia F, Avruch J. MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation. *Curr Biol CB.* 2008;18:311–21.

13. Robertson A, Mohamed TMA, El Maadawi Z, Stafford N, Bui T, Lim D-S, 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.* 2017;20:42–9.
14. Katagiri K, Katakai T, Ebisuno Y, Ueda Y, Okada T, Kinashi T. Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. *EMBO J.* 2009;28:1319–31.
15. Liang Y, Li K, Riecken K, Maslyukov A, Gomez-Nicola D, Kovalchuk 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.* 2016;26:805–21.
16. Xu X, Wang X, Todd EM, Jaeger ER, Vella JL, Mooren OL, et al. Mst1 Kinase Regulates the Actin-Bundling Protein L-Plastin To Promote T Cell Migration. *J Immunol.* 2016;197:1683–91.
17. 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;18:2976–86.
18. Seidel C, Schagdarsurengin U, Blümke K, Würfl P, Pfeifer GP, Hauptmann S, et al. Frequent hypermethylation of MST1 and MST2 in soft tissue sarcoma. *Mol Carcinog.* 2007;46:865–71.
19. Levallet G, Vaisse-Lesteven M, Stang NL, Ilg AGS, Brochard P, Astoul P, 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.* 2012;7:599–606.
20. 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;76:1627–40.
21. Yang N, Morrison CD, Liu P, Miecznikowski J, Bshara W, Han S, et al. TAZ induces growth factor-independent proliferation through activation of EGFR ligand amphiregulin. *Cell Cycle.* 2012;11:2922–30.
22. Woodard GA, Yang Y-L, You L, Jablons DM. Drug development against the hippo pathway in mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res.* 2017;6:335–42.
23. Steinmann K, Sandner A, Schagdarsurengin U, Dammann RH. Frequent promoter hypermethylation of tumor-related genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2009;22:1519–26.
24. Fukuhara T, Tomiyama T, Yasuda K, Ueda Y, Ozaki Y, Son Y, et al. Hypermethylation of MST1 in IgG4-related autoimmune pancreatitis and rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;463:968–74.
25. Miyanaga A, Masuda M, Tsuta K, Kawasaki K, Nakamura Y, Sakuma T, et al. Hippo Pathway Gene Mutations in Malignant Mesothelioma: Revealed by RNA and Targeted Exon Sequencing. *J Thorac Oncol.* 2015;10:844–51.
26. Sekido Y. Inactivation of Merlin in malignant mesothelioma cells and the Hippo signaling cascade dysregulation: Merlin inactivation in mesothelioma. *Pathol Int.* 2011;61:331–44.
27. Tranchant R, Quétel L, Tallet A, Meiller C, Renier A, Koning L de, et al. Co-occurring Mutations of Tumor Suppressor Genes, LATS2 and NF2, in Malignant Pleural Mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2017;23:3191–202.
28. Lin X, Cai F, Li X, Kong X, Xu C, Zuo X, et al. Prognostic significance of mammalian sterile 20-like kinase 1 in breast cancer. *Tumor Biol.* 2013;34:3239–43.

29. Sohn BH, Shim J-J, Kim S-B, Jang KY, Kim SM, Kim JH, et al. Inactivation of Hippo Pathway Is Significantly Associated with Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22:1256–64.
30. Yu J, Zhai X, Li X, Zhong C, Guo C, Yang F, et al. Identification of MST1 as a potential early detection biomarker for colorectal cancer through a proteomic approach. *Sci Rep [Internet].* 2017 [cited 2017 Oct 31];7. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-14539-x>
31. 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.* 2014;45:853–60.
32. Fallahi E, O'Driscoll N, Matallanas D. The MST/Hippo Pathway and Cell Death: A Non-Canonical Affair. *Genes.* 2016;7:28.
33. Galan JA, Avruch J. MST1/MST2 Protein Kinases: Regulation and Physiologic Roles. *Biochemistry (Mosc).* 2016;55:5507–19.
34. Oh HJ, Lee K-K, Song SJ, Jin MS, Song MS, Lee JH, et al. Role of the Tumor Suppressor RASSF1A in Mst1-Mediated Apoptosis. *Cancer Res.* 2006;66:2562–9.
35. 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.* 2013;45:268–79.
36. Xu CM, Liu WW, Liu CJ, Wen C, Lu HF, Wan FS. Mst1 overexpression inhibited the growth of human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* 2013;20:453–60.
37. Zhou X, Li Y, Zhang Y, Xu Y, Yuan D, Wang X. Expression of YAP and Inhibitory Effect By IGF-1R Suppressor in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood.* 2016;128:892–892.
38. Neto F, Klaus-Bergmann A, Ong YT, Alt S, Vion A-C, Szyzborska A, et al. YAP and TAZ regulate adherens junction dynamics and endothelial cell distribution during vascular development. *eLife [Internet].* [cited 2018 Mar 25];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5814147/>
39. Hansen CG, Moroishi T, Guan K-L. YAP and TAZ: a nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends Cell Biol.* 2015;25:499–513.
40. Knights AJ, Funnell APW, Crossley M, Pearson RCM. Holding Tight: Cell Junctions and Cancer Spread. *Trends Cancer Res.* 2012;8:61–9.
41. Zhang W-Q, Dai Y-Y, Hsu P-C, Wang H, Cheng L, Yang Y-L, et al. Targeting YAP in malignant pleural mesothelioma. *J Cell Mol Med [Internet].* 2017 [cited 2017 Aug 14]; Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jcmm.13182>
42. Wang C, Zhu X, Feng W, Yu Y, Jeong K, Guo W, et al. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am J Cancer Res.* 2016;6:27.
43. Hesson L, Bièche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, et al. Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene.* 2004;23:2408–19.
44. Hesson LB, Wilson R, Morton D, Adams C, Walker M, Maher ER, et al. CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations. *Oncogene.* 2005;24:3987–94.
45. Schagdarsurengin U, Gimm O, Hoang-Vu C, Dralle H, Pfeifer GP, Dammann R. Frequent Epigenetic Silencing of the CpG Island Promoter of RASSF1A in Thyroid Carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62:3698–701.

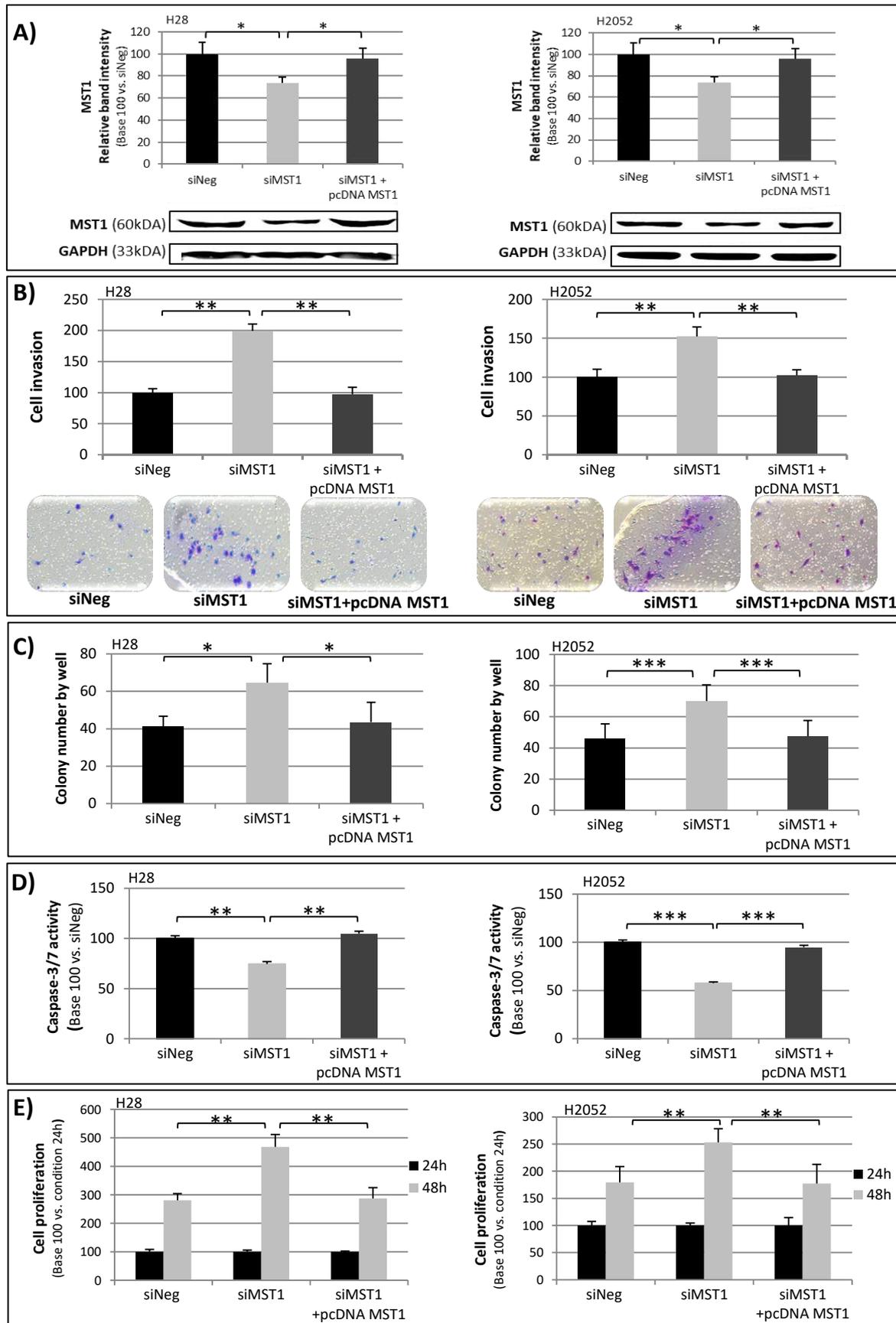


Figure S1. MST1 depletion increases cell invasion, anchorage-independent growth, proliferation while decrease apoptosis H28 and H2052. (A-E) H28 and H2052 cells were transfected with siNeg, siMST1 or siMST1+pcDNAMST1. Expression of MST1 was analyzed by western blot (A) using GAPDH as an internal control. (B) Invasion capacity of transfected cells on BioCoat Matrigel Invasion Chamber. Representative picture is shown under histograms. (C) Quantification of colony in soft agar after 21 days. (D) Caspase 3/7 activity. (E) Cell proliferation assays. For all of histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001, using an ANOVA test followed by Dunnett's test.

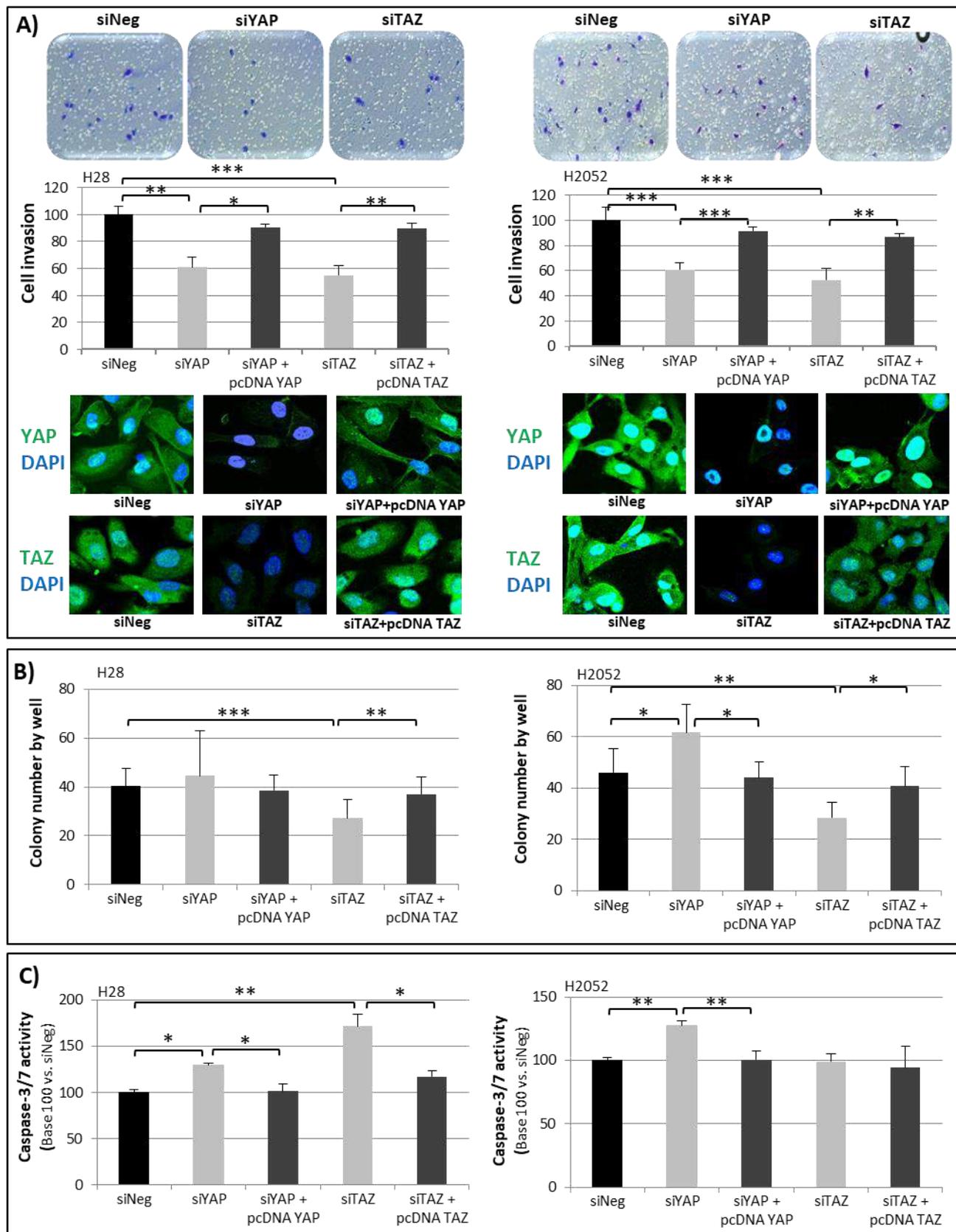
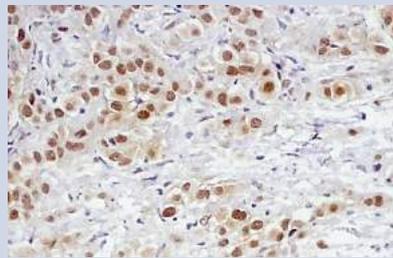
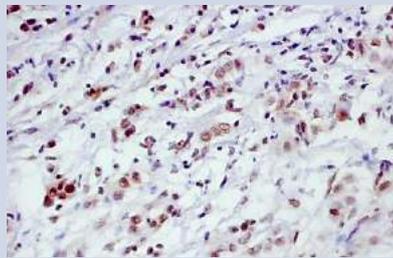


Figure S2. YAP or TAZ depletion decreases cell invasion, anchorage-independent growth while increase apoptosis. (A-C) H28 and H2052 cells were transfected with siNeg, siYAP, siTAZ in combination or not with pcDNA YAP or TAZ. Experiments performed 48h hours after transfection.

A) Invasion capacity of transfected cells on BioCoat Matrigel Invasion Chamber and representative picture is shown above histograms. Representative image of the extinction of YAP and TAZ is shown under the histograms. **B)** Quantification of colony in soft agar after 21 days. **C)** Caspase 3/7 activity. For all of histograms, error bars indicate the SEM of at least three independent experiments. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001, using an ANOVA test followed by Dunnett's test.

Tableau 11 : Conditions expérimentales des outils moléculaires utilisés pour l'analyse immunohistochimique de YAP et TAZ des patients inclus dans l'essai clinique MAPS.

	YAP	TAZ
Prétraitement	pH9 - 20 min au bain-marie	pH9 - 20 min au bain-marie
Blocage des sites non spécifique	T-TBS-5% BSA - 60 min	T-TBS-5% BSA - 60 min
Anticorps primaire	lapin polyclonal Dilution : 1/100ème Incubation sur la nuit à 4°C	lapin polyclonal Dilution : 1/100ème Incubation sur la nuit à 4°C
Révéléateur	Kit Novolink (Leica®, Ménarini)	Kit Novolink (Leica®, Ménarini)
Marquage	Nucléaire et/ou cytoplasmique	Nucléaire et/ou cytoplasmique
Témoin interne	Cellules basales de l'épithélium	Cellules basales de l'épithélium
Exemple d'immunomarquage		
Nombre de cas testé	306/448	306/448
Médiane	240	180
1^{er} quartile	180	100
3^{ème} quartile	300	210
Moyenne	220,12	162,10

Nous avons compris dans ce travail que la perte d'expression de MST1 était un facteur de mauvais pronostic car l'absence de MST1 dans des cellules de lignées mésothéliales tumorales favorisent l'invasion cellulaire, la capacité des cellules à croître sans adhésion, la prolifération cellulaire et diminue l'activité apoptotique basale. Ces effets induits par la perte d'expression de MST1 sont dû à une accumulation nucléaire de YAP a priori actif et à une rétention cytoplasmique de TAZ. Ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors de la caractérisation des modèles cellulaires d'étude du MPM rapportant des arguments qui montre que YAP et TAZ ne sont pas équivalent dans la cellule mésothéliale et que YAP est associé à un phénotype plus agressif.

Nous avons alors voulu savoir dans un deuxième temps si les effecteurs terminaux de la voie Hippo pouvaient être des biomarqueurs/des outils de suivi des patients atteints de MPM.

I.D. Résultats complémentaires

L'expression protéique de YAP et TAZ a été déterminée sur les prélèvements des patients atteints de MPM et inclus dans l'essai MAPS par une IHC : des coupes de 3 µm des blocs de paraffine contenant les prélèvements tumoraux ont été réalisées. Les coupes ont été prétraitées par un tampon de démasquage des épitopes composé d'EDTA. Après blocage des peroxydases endogènes, les coupes ont été incubées en présence de l'anticorps commercial anti-YAP ou-TAZ (Cell signaling®). Les complexes antigènes-anticorps ont été révélés par un anticorps secondaire couplé à de la peroxydase (kit Novolink®, Ménarini) (Tableau 11). Les sections ont été contre-colorées à l'hématoxyline. Les marquages IHC ont été quantifiés par le Dr Claire Danel (Hopital Bichat (cohorte Française) selon un score semi-quantitatif (score = **Intensité du marquage** (0: nul, 1: faible, 2: modéré, 3: fort comparé au témoin interne) x **% de cellules tumorales marquées** soit un score variant de 0 à 300). Les scores ont ensuite été confrontés aux données de survie des patients inclus dans l'essai MAPS.

L'influence de chaque marqueur a été évaluée par un test d'interaction dans un modèle multivarié (Cox pour la survie, régression logistique pour la réponse) incluant les variables cliniques pertinentes. Une stratégie d'analyse en 2 étapes avec correction de Bonferroni-Holm permet de limiter le risque de faux-positifs.

Les IHC YAP et TAZ ont pu être effectuées sur 306/448 patients atteints de MPM et inclus dans MAPS (soit 68,3% des cas). Le score moyen de YAP est de 220+/-84,3, la médiane de 240. YAP est fréquemment exprimé par les cellules mésothéliales tumorales, seuls 4/306 cas présentaient un immunomarquage négatif.

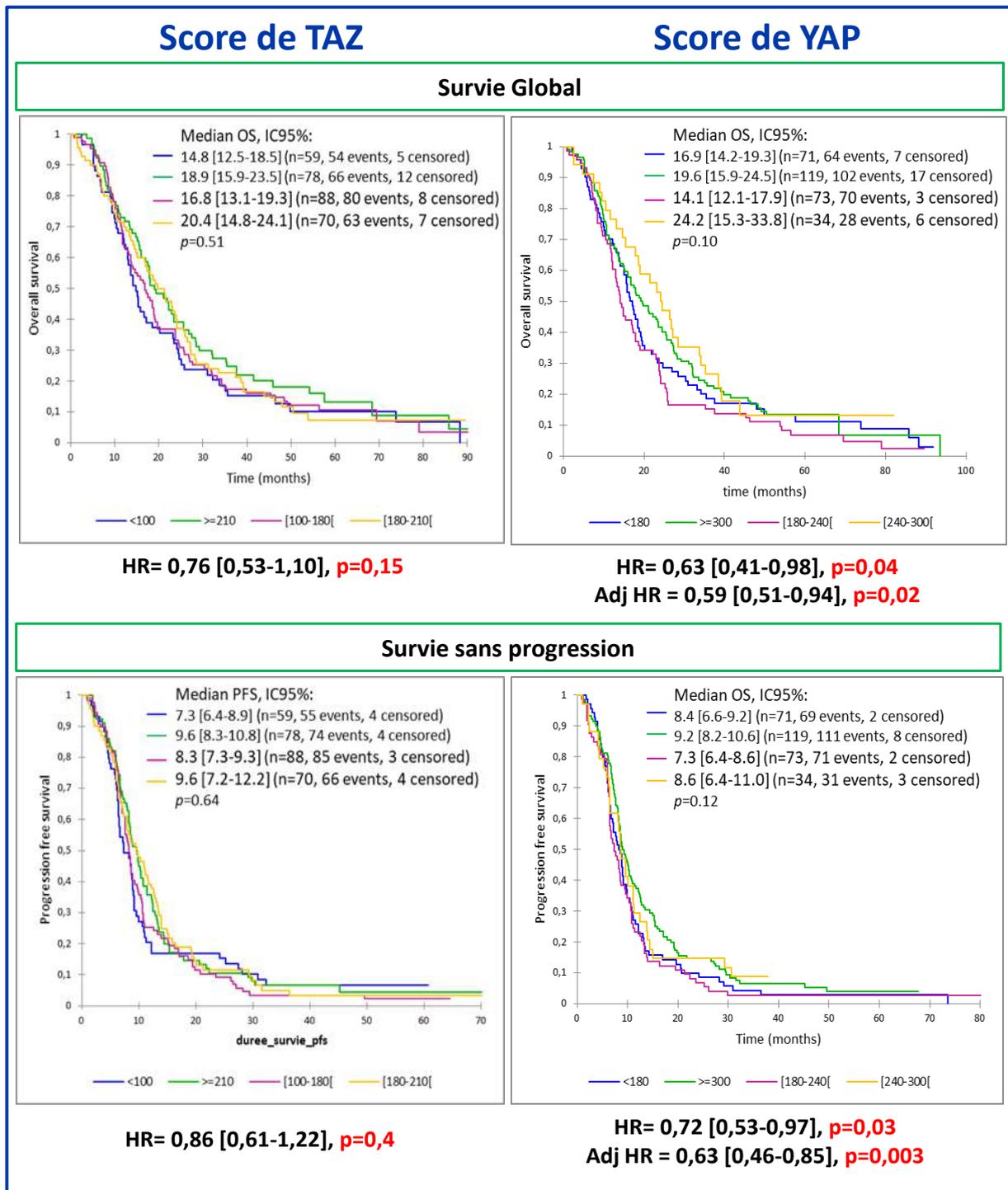


Figure 59 : L'expression élevée de YAP prédit une meilleure survie globale (OS: Overall survival) et survie sans progression (PFS: Progression Free Survival) des patients atteints de MPM et enrôlés dans l'essai MAPS.

Adj HR :Ajustement sur le sexe, l'âge, l'histologie, le PS, l'hémoglobine, les globules blancs, et les plaquettes.

Le score moyen de TAZ est de 162,10+/-95,26, la médiane de 180. Comme YAP, TAZ est fréquemment exprimé par les cellules mésothéliales tumorales, seuls 12/306 cas présentaient un immunomarquage négatif.

Que ce soit pour YAP ou TAZ, la localisation subcellulaire (nucléaire ou cytoplasmique prédominante) de ces co-facteurs transcriptionnels n'influence pas la survie globale et sans progression des patients atteints de MPM (données non montrées). Si le niveau d'expression de TAZ n'est aucunement corrélé à la survie globale ou survie sans progression des patients atteints de MPM et inclus dans MAPS, contre toutes attentes, le niveau d'expression de YAP s'est avéré être un facteur de bon pronostic : la médiane de survie globale des patients dont le score d'expression de YAP est inférieure à 180 est de 16,9 mois contre 24,2 mois pour les patients dont le score d'expression de YAP est compris entre 240 à 300 ($p=0,02$ en analyse multivariée) (Figure 59).

De la même façon, la médiane de survie sans progression des patients dont le score d'expression de YAP est inférieure à 180 est de 8,4 mois contre 9,2 mois pour les patients dont le score d'expression de YAP est de 300 ($p=0,003$ en analyse multivariée) (Figure 59). Bien sûr, l'IHC réalisée ici, ne permet pas de savoir si YAP s'accumule sous forme active ou inactive puisque l'anticorps utilisé ici reconnaît la forme totale de YAP, il n'est pas possible de savoir si ces données sont en contradiction avec les données que notre groupe a obtenu *in vitro*, à savoir que les effets délétères provoqués par l'absence de MST1 sont YAP dépendant. Il conviendrait pour trancher de réaliser un immunomarquage de P-Tyr357-YAP, cette phosphorylation en faveur de l'activation transcriptionnelle de YAP (Pijuan-Galitó *et al.*, 2014). Malheureusement, les prélèvements de cette collection MAPS étaient trop entamés pour nous permettre une analyse complémentaire et à l'initiation de ce travail aucun anticorps anti P-Tyr357-YAP n'était disponible pour des techniques d'IHC.

Pour comprendre cette apparente contradiction il est important de prendre en compte les travaux de la littérature démontrant que YAP peut être à la fois un oncogène et un gène suppresseur de tumeur, en particulier dans les cancers mammaires. En effet, dans le cancer mammaire, il a été initialement rapporté que YAP se comporte comme un oncogène, car induisant l'expression de gènes impliqués dans la reprogrammation de cellules de lignées cancéreuses mammaires en cellules souches mammaires tel que le gène codant pour l'IL6 (Kim *et al.*, 2015).

Toutefois, à l'inverse, Yuan et collaborateurs ont rapporté que l'extinction de YAP par siARN dans des cellules de lignées de carcinomes mammaires favorisait la migration et l'invasion, inhibait la réponse au taxol, supprimait l'anoikis et favorisait *in vivo* la survenue de tumeurs chez la souris, traduisant dans ce modèle cellulaire un possible rôle suppresseur de tumeur (Yuan *et al.*, 2008).

De plus, notre équipe a démontré que l'inactivation de YAP par siARN ne suffit pas à pleinement contrecarrer les effets de l'absence d'expression du gène suppresseur RASSF1A, le régulateur négatif en amont de la voie Hippo dans des lignées de cellules épithéliales bronchiques (Dubois *et al.*, 2016). En effet si les cellules de la lignée bronchique HBEC-3 acquièrent la capacité à croître en agar lorsqu'elles n'expriment plus RASSF1A, l'extinction concomitante de RASSF1A/YAP ne leur fait pas perdre cette capacité alors que l'inactivation de YAP empêche les cellules HBEC-3 dépourvues de RASSF1A de migrer en 2D, 3D ou envahir des matrice de Matrigel® (Dubois *et al.*, 2016).

D'après la littérature et le travail réalisé au sein de notre groupe, il est établi que la perte de RASSF1A conduit à la translocation nucléaire du cofacteur transcriptionnel YAP sous sa forme active faisant de cette protéine, en plus de ses nombreux rôles, un régulateur de la voie Hippo.

Plusieurs auteurs ont montré que RASSF1A pourraient contrôler la fonctionnalité de la voie Hippo (Bitra *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2007). Ainsi, l'inactivation de RASSF1A dans les MPM même si elle n'influence pas à elle seule la survie des patients dans notre série, renforce l'hypothèse que la voie de signalisation Hippo joue un rôle déterminant dans la carcinogenèse pleurale de par le contrôle qu'elle exerce sur l'activité des co-facteurs de transcription YAP/TAZ et des kinases MST.

Nous avons voulu déterminer dans la suite de ce travail la part de RASSF1A dans la carcinogenèse pleurale.

Tableau 12 : Liste des siARN et plasmides utilisés pour la modification transitoire de RASSF1A et RASSF1C.

siARN	siRNA négatif (siNeg)
	siRNA-anti RASSF1A (siRASSF1A-1) : 5'-GACCUCUGUGGGCGACUUCATT-3'
	siRNA-anti RASSF1A (siRASSF1A-2) : 5'CAAGGACGGUUCUUACACA-3'
Plasmide	Plasmide vide (pcDNA3)
	Plasmide RASSF1A (pcDNA3-RASSF1A)
	Plasmide RASSF1C (pcDNA3-RASSF1C)

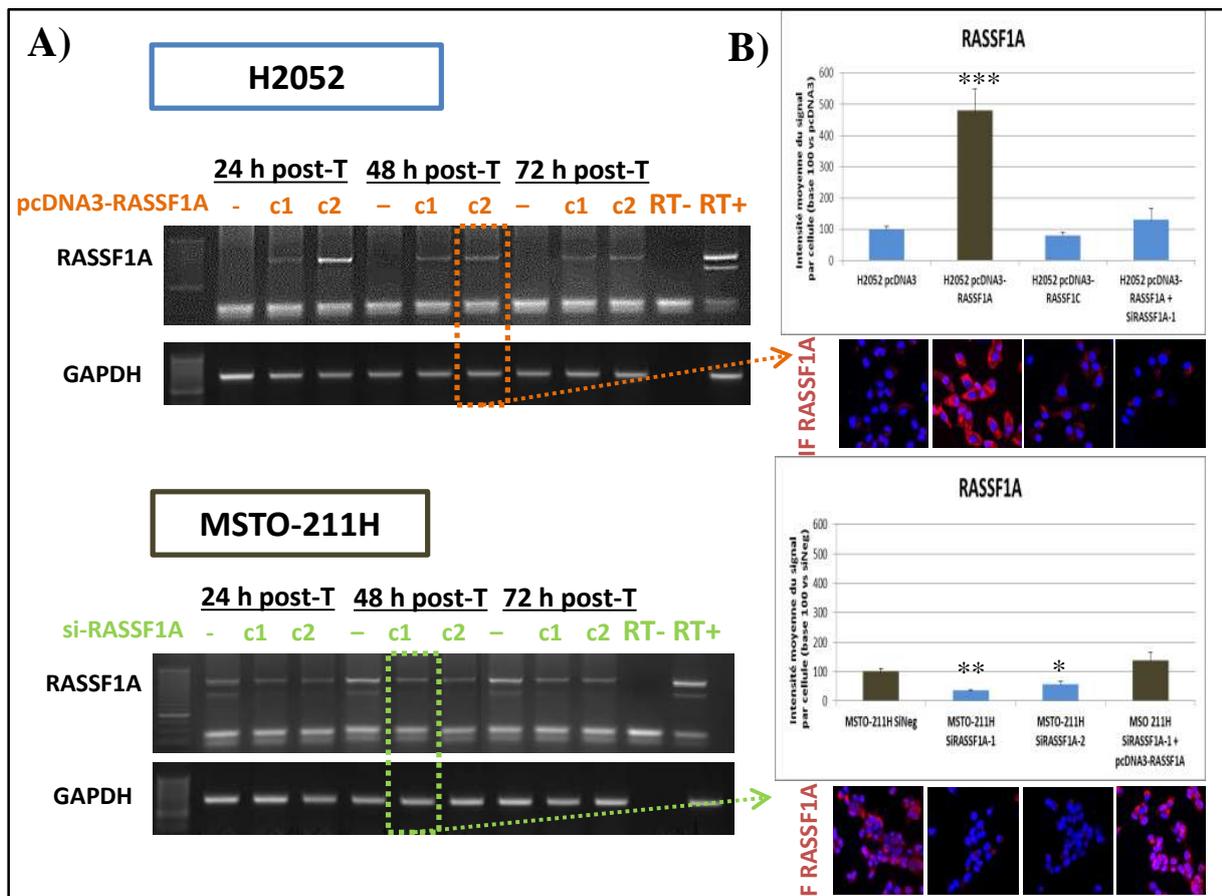


Figure 60 : Cinétique d'expression/extinction de RASSF1A par plasmide/siARN dans les lignées H2052 et MSTO-211H.

Les cellules des lignées H2052 et MSTO-211H sontensemencées dans du milieu RPMI/L glutamine-10% SVF puis transfectées, après avoir atteint 30% de confluence, avec le plasmide RASSF1A (H2052) ou le siRASSF1A (MSTO-211H) à deux concentrations différentes (SiRASSF1A: 10nM (c1) et 25nM (c2) ; Plasmide RASSF1A: 2pM (c1) ou 4pM (c2)). La transfection est arrêtée après 24h, 48h ou 72h puis les ARN sont extraits et amplifiés par RT-PCR semi-quantitative. **A)** Acquisition numérique des produits de PCR ciblant RASSF1A séparés sur gel d'agarose 4,5%. **B)** Détection protéique de RASSF1A quantifiée par immunofluorescence, après 48h de transfection et à une concentration de 10 nM pour les siNeg, RASSF1A-1 et 2 et de 4pM pour pcDNA, plasmide RASSF1A et de 5pM pour le plasmide RASSF1C (n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, * vs. Condition pcDNA (H2052) ou siNeg (MSTO-221H), *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001)).

II. L'inactivation de RASSF1A contribue à « l'agressivité » des cellules de lignées mésothéliales tumorales car elle favorise la translocation nucléaire de YAP et l'expression d'amphiréguline

II.A.1. Mises au point des extinctions/réexpressions

Nous avons dans un premier temps dû définir les outils moléculaires nécessaires à la perte d'expression de RASSF1A (lignées exprimant nativement cette protéine) ou de sa réexpression (lignées hyperméthylées) dans les cellules de lignées mésothéliales humaines.

Afin de modifier l'expression de RASSF1A, nous réalisons 24h après l'ensemencement (lorsque les cellules atteignent environ 30% de confluence) une transfection à l'aide d'un agent transfectant (0,2% de lipofectamine RNAiMAX® Invitrogen®) par l'un des différents siARN et/ou plasmides souhaités (Tableau 12), dans du milieu RPMI dépourvu d'antibiotiques. Après 6h de transfection, les tapis cellulaires sont lavés et ré-incubés en présence de leur milieu de culture usuel.

Les quantités de siARN et plasmides à transférer ainsi que la cinétique d'extinction/surexpression de RASSF1A ont été déterminées (Figure 60). L'extinction transitoire de RASSF1A dans les lignées H2452 et MSTO-211H a été réalisée (Figure 60) en utilisant deux siARN-antiRASSF1A : l'un dont la séquence, décrite initialement par Shivakumar, est celle employée dans les travaux visant à éteindre l'expression de RASSF1A (Shivakumar *et al.*, 2002), le second, un siARN commercial dont la séquence a été désignée par la société Invitrogen®. Nos expériences préliminaires démontrent qu'une concentration de 10 nM de ces siARN éteint de façon reproductible l'expression du variant RASSF1A dans ces lignées dès 24h et jusqu'à 72h suivant la transfection (Figure 60).

Afin de s'assurer que les effets observés par la suite ne sont imputables qu'à l'extinction du gène RASSF1A et non à la sensibilisation des cellules par le protocole de transfection, un groupe de cellules est en parallèle systématiquement transfecté par une même quantité de siARN-Négatif (produit sans effet d'interférence ARN, de pourcentage en base GC identique à celui des siARN d'intérêt, figurant l'effet d'une entrée d'ARN exogène dans les cellules).

L'expression transitoire de RASSF1A dans les lignées H2052 et H28 a été réalisée (Figure 60) en utilisant un plasmide contenant la séquence codante de RASSF1A (pcDNA3-RASSF1A, don généreux de Jacques Camonis).

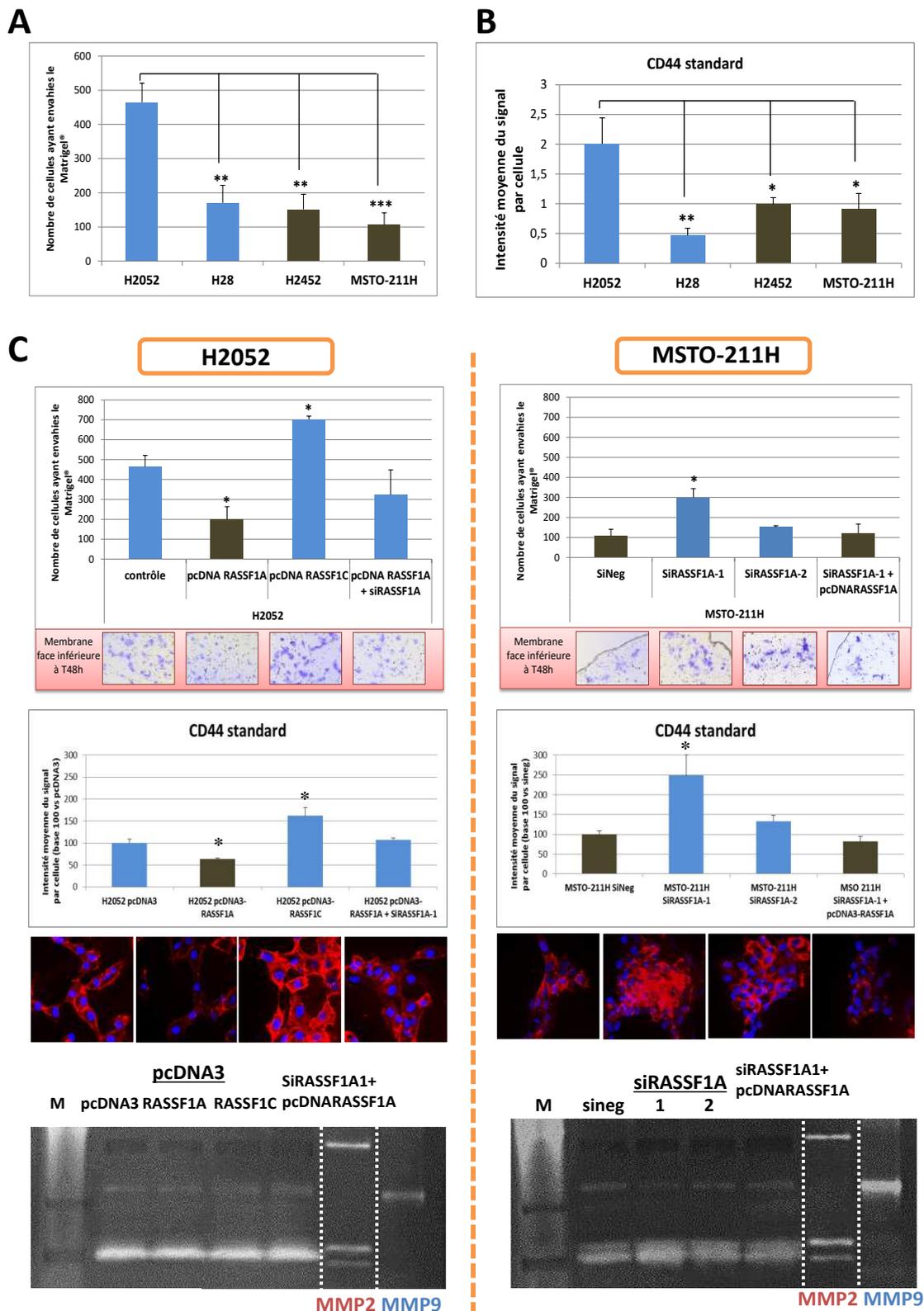


Figure 61 : La capacité des cellules de lignées mésothéliales humaines à envahir une matrice est liée au taux d'expression du CD44 standard. Après avoir caractérisé la capacité des cellules des lignées mésothéliales à envahir une couche de Matrigel® (A) et l'expression du CD44 standard (B), l'influence de la modification transitoire de l'expression de RASSF1A (ré-expression pour la lignée H2052, extinction pour la lignée MSTO-211H) sur l'invasion, l'expression du CD44 standard et l'activité des MMP2 et 9 (C) a été testée (n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, * vs. condition pcDNA3 (H2052) ou siNeg (MSTO-211H), * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001).

La concentration de 4 pM est la concentration retenue pour ré-introduire l'expression de RASSF1A dans ces lignées ; elle restaure l'expression de RASSF1A dès 24h et jusqu'à 72h après la transfection. En parallèle, pour certifier la spécificité des effets de ce plasmide, un groupe de cellules a été transfecté par une plasmide « vide » (pcDNA3) ou portant la séquence codante de RASSF1C (décrit pour avoir des effets opposés à ceux de RASSF1A) (Reeves *et al.*, 2010).

II.A.2. La présence de RASSF1A diminue la capacité des cellules de lignées de MPM à envahir le Matrigel® et l'expression du CD44 standard.

La capacité des cellules des quatre lignées mésothéliales humaines à envahir une couche de Matrigel® en chambre de Boyden (test d'invasion, chambre de Boyden recouverte d'une couche de Matrigel®) ainsi que l'expression de marqueurs de l'agressivité du MPM dont le CD44 standard (qui *via* son segment intracellulaire, est capable de piéger NF2 (Morrisson *et al.*, 2001) comme d'inhiber l'activité des kinases MST (Xu *et al.*, 2010)) par ces cellules ont été évaluées.

La Figure 61A montre que les cellules de la lignée H2052 ont une capacité invasive significativement plus élevée que celles des trois autres lignées (d'environ 3 à 4 fois plus, $p < 0,01$), ces dernières envahissant de façon comparable le Matrigel®.

De façon intéressante, il est apparu que le taux d'expression du CD44 standard était en miroir de cette capacité à envahir une matrice ou non : l'expression du CD44 standard est ainsi significativement plus élevée dans les cellules des lignées H2052 que dans les trois autres lignées (d'environ 2 à 4 fois plus selon les lignées, $p < 0,05$) (Figure 61B).

Les effets de la modification transitoire de l'expression de RASSF1A dans ces lignées sur l'invasion, l'expression du CD44 standard, et l'activité de MMP2 et MMP9 (zymographie) ont été évalués (Figure 61C). Les cellules de la lignée H2052 ou H28 (donnée non montrée) transfectées avec le plasmide RASSF1A ont une capacité invasive et un taux d'expression protéique du CD44 significativement diminués en comparaison aux cellules contrôle (transfectées avec le plasmide vide, ($p < 0,05$)). A l'inverse, la transfection du plasmide RASSF1C augmente significativement l'invasion et l'expression du CD44 standard des cellules de la lignée H2052 ($p < 0,05$) comme des H28 (donnée non montrée). L'analyse des zymogrammes révèle que les activités des MMP2 et MMP9 n'évoluent pas significativement selon que les cellules de la lignée H2052 ou H28 aient été transfectées par le plasmide RASSF1A ou RASSF1C, comme l'illustre le zymogramme Figure 61C pour les cellules de la

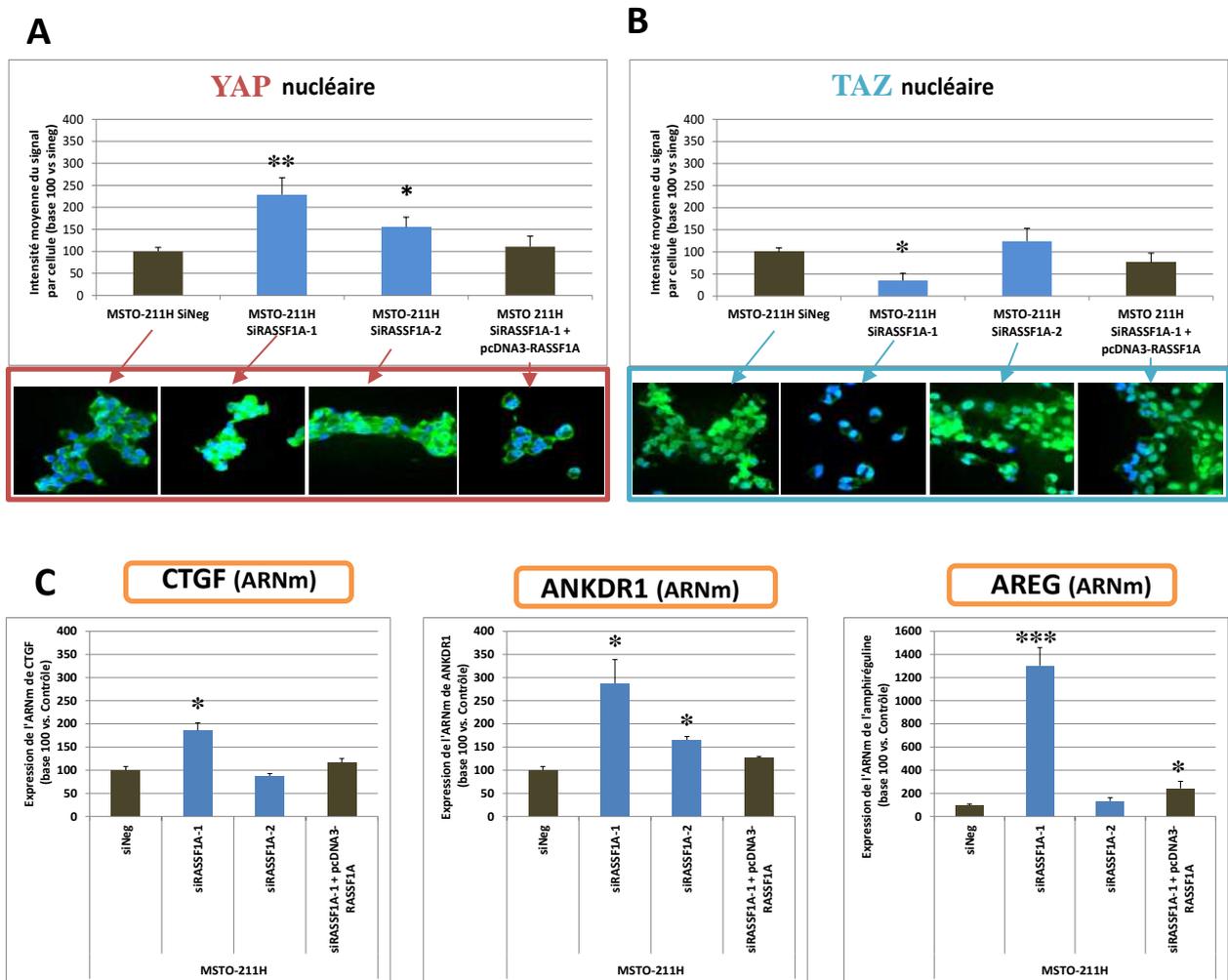


Figure 62 : Le gain d'invasion induit par la perte d'expression de RASSF1A dans les cellules de la lignée MSTO-211H s'accompagne d'une translocation nucléaire de YAP actif.

A 48h post-transfection des siARN (siNeg ou anti-RASSF1A), les cellules cultivées sur lamelle de verre sont fixées, perméabilisées puis une immunodétection de YAP (A) et TAZ (B) est réalisée comme décrit dans la section « Matériels et Méthodes ». En parallèle, les ARNs ont été extraits et l'expression des gènes cibles de YAP/TAZ: CTGF, ANKDR1 et amphiréguline (AREG) quantifiées par RT-qPCR (C).

n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, * vs. condition siNeg, * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$.

lignée H2052. A l'inverse et comme décrit par notre groupe dans les lignées épithéliales bronchiques humaines, l'extinction de RASSF1A dans les cellules de la lignée MSTO-211H (par le siRASSF1A-1) ou H2452 (siRASSF1A-1 et -2, donnée non montrée) augmente significativement l'invasion et l'expression du CD44 standard dans ces cellules ($p < 0,05$; ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett $n=3$). L'augmentation de la capacité des cellules de la lignée MSTO-211H à envahir une matrice (i.e. en absence de RASSF1A) s'accompagne d'une augmentation de l'activité de la MMP2 (+50%, $p < 0,05$) tandis qu'en parallèle l'activité de MMP9 est significativement diminuée (-50%, $p < 0,05$). Pour les cellules de la lignée H2452, l'augmentation d'invasion provoquée par la perte d'expression de RASSF1A s'accompagne à l'inverse d'une augmentation d'activité de la MMP9 (+80%, $p < 0,05$) tandis que l'activité de la MMP2 est inchangée.

Nous avons établi pour la première fois à notre connaissance, un lien inversement proportionnel entre les taux de RASSF1A et de CD44 standard. Ce lien pourrait s'expliquer par le fait que le facteur de transcription ETS-1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1), gouvernant l'expression génique du CD44, est activé par la signalisation JNK (Zhang *et al.*, 2013), qui est, elle, réprimée par RASSF1A (Whang *et al.*, 2005). Le CD44 standard reflétant l'agressivité des cellules mésothéliales tumorales, pourrait constituer un biomarqueur d'intérêt en routine pour suivre l'évolution des patients atteints de MPM.

II.A.3. La perte d'expression de RASSF1A modifie l'activité des effecteurs terminaux YAP/TAZ des cellules de lignées MSTO-211H et H2452

Nous avons suivi la localisation subcellulaire par IF des deux effecteurs terminaux de la voie Hippo, les co-facteurs transcriptionnels YAP et TAZ dans ces cellules selon qu'elles expriment ou non RASSF1A. Nous montrons dans la lignée MSTO-211H que la perte d'expression de RASSF1A par transfection du siRASSF1A-1 induit une augmentation significative de l'intensité du signal nucléaire de YAP ($p < 0,01$) (Figure 62A) tandis que le signal nucléaire de TAZ diminue ($p < 0,05$) (ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett $n=3$) comparé au contrôle (siNég) (Figure 62B). Les cellules de la lignée MSTO-211H transfectées par le siRASSF1A-1 expriment significativement davantage les messagers des gènes cibles de YAP/TAZ : CTGF (X1,7), ANKDR1 (X2,8) et AREG (X13) ($p < 0,05$, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett $n=3$) que les cellules témoin (siNég) (Figure 62C) témoignant que la translocation nucléaire de YAP est bien associée à une augmentation de son activité de régulation transcriptionnelle.

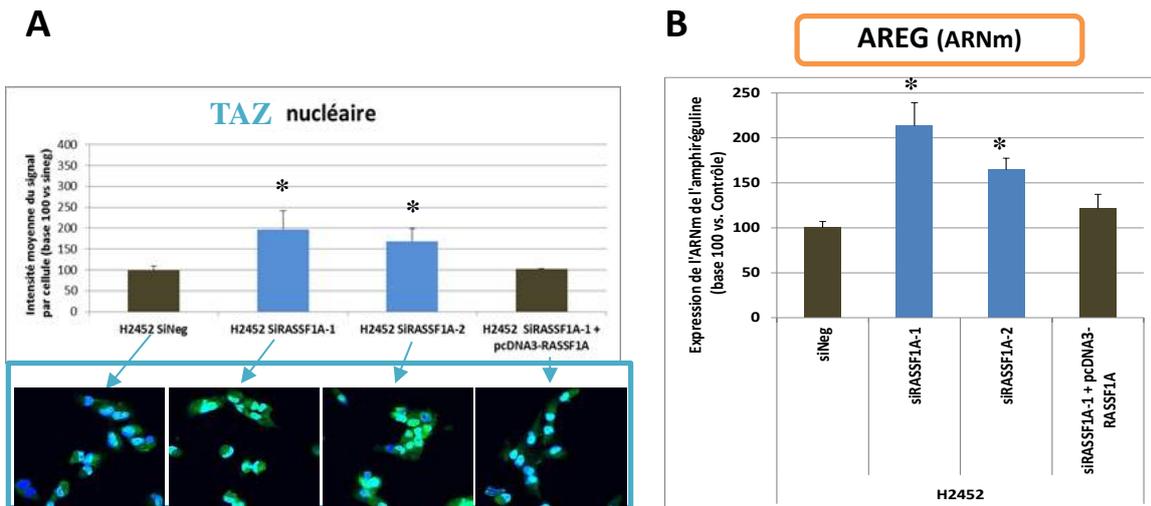


Figure 63 : Le gain d'invasion induit par la perte d'expression de RASSF1A dans les cellules de la lignée H2452 s'accompagne d'une translocation nucléaire de TAZ actif.

A 48h post-transfection des siARN (siNeg ou anti-RASSF1A), les cellules cultivées sur lamelle de verre sont fixées, perméabilisées puis une immunodétection de TAZ (A) est réalisée comme décrit dans la section « Matériels et Méthodes ». En parallèle, les ARNs ont été extraits et l'expression l'amphiréguline (AREG) quantifiées par RT-qPCR (B).

(n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, * vs. condition siNeg, * : p<0,05, ** : p<0,01, *** : p<0,001).

Le siRASSF1A-2 qui n'augmente pas l'invasion des cellules MSTO-211H augmente modérément mais significativement le signal nucléaire de YAP (Figure 62A) dans ce cas, seule l'expression de ANKDR1 est significativement augmentée ($p < 0,05$) (Figure 62C). Le signal nucléaire de TAZ reste alors lui inchangé (Figure 62B).

Contrairement aux données obtenues dans les lignées bronchiques ou la lignée MSTO-211H, dans les cellules de la lignée H2452, l'augmentation de l'invasion provoquée par la transfection du siRASSF1A-1 ou -2 ne s'accompagne pas d'une modification de l'intensité du signal nucléaire de YAP (donnée non montrée) mais est associée à une augmentation du signal nucléaire de TAZ (Figure 63A). Les cellules de la lignée H2452 dépourvues de RASSF1A expriment alors davantage l'un des gènes cibles de YAP/TAZ bien que plus modérément que ce qui est mesuré dans les MSTO-211H : AREG (X1,6 à 2, $p < 0,05$) (Figure 63B). Ce résultat est cohérent avec le fait que l'extinction de RASSF1A dans les MSTO-211H par le siRASSF1A-1 augmente d'un facteur 3 leur capacité à envahir la Matrigel® alors que l'inactivation de RASSF1A n'augmente que d'à peine 2 fois la capacité d'invasion des cellules H2452.

La dérégulation de l'expression de l'amphiréguline semble être impliquée dans l'invasion des cellules de MPM. En effet, nous rapportons une corrélation entre l'expression de l'AREG et la capacité d'invasion des cellules de MPM.

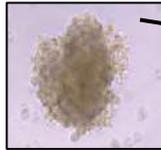
Nous avons étudié l'impact sur l'expression de l'AREG de la ré-expression de RASSF1A dans les cellules des lignées H2052 ou H28. La transfection de RASSF1A ne modifie pas la localisation subcellulaire de YAP ou TAZ (donnée non montrée) ni l'expression des gènes cibles de YAP/TAZ bien qu'elle diminue l'invasion en Matrigel® de ces cellules.

Néanmoins, il est à noter que le niveau d'expression du messager de l'amphiréguline est bien plus élevée, de base, dans les lignées H2052 et H28 qui n'expriment pas RASSF1A ($CT_{(AREG)}$ respectivement à $28,66 \pm 0,18$ et $22,05 \pm 0,07$) que dans les cellules des lignées H2452 et MSTO-211H, qui, elles, expriment nativement RASSF1A ($CT_{(AREG)}$ respectivement à $31,68 \pm 0,32$ et $30,86 \pm 0,28$).

Ces données confirment, dans un modèle de MPM, un lien entre le taux de RASSF1A et l'activité des effecteurs terminaux de la voie de signalisation Hippo, que sont YAP et TAZ et suggèrent que la dérégulation de l'amphiréguline provoquée par la perte d'expression de RASSF1A puisse participer à la formation de ces tumeurs.

Caractérisation des cellules

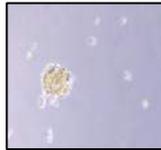
H2052
Nb de sphère : 13 +/- 4
Diam. : 374 +/- 95 µm



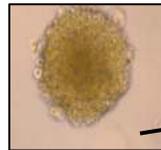
H28
Nb de sphère : 6 +/- 1
Diam. : 152 +/- 30 µm



H2452
Nb de sphère : 10 +/- 1
Diam. : 107 +/- 27 µm



MSTO-211H
Nb de sphère : 11 +/- 2
Diam. : 652 +/- 177 µm



Modification transitoire de l'expression de RASSF1A

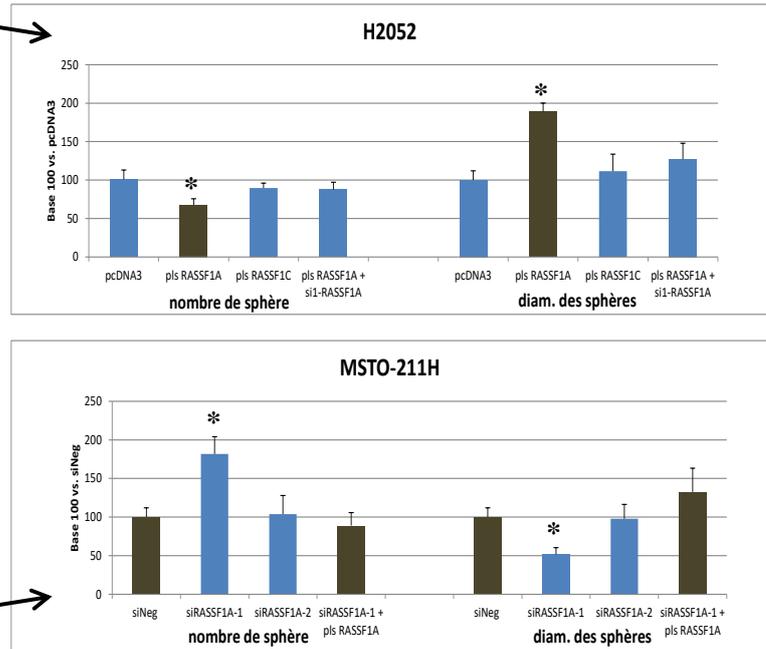


Figure 64 : Impact de la modification transitoire de RASSF1A sur la capacité des cellules de lignées mésothéliales à croître en culture 3D.

Après avoir caractérisé la capacité des cellules des lignées mésothéliales à croître en 3D, l'influence de la modification transitoire de l'expression de RASSF1A (ré-expression pour la lignée H2052, extinction pour la lignée MSTO-211H) sur ces modèles de cultures sans adhésion est testée (n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, * vs. condition pcDNA3 (H2052) ou siNeg (MSTO-211H), * : p<0,05).

II.A.4. La perte d'expression de RASSF1A favorise la dissémination des cellules de la lignée MSTO-211H en culture 3D ou en agar

La capacité des lignées H2052, H28, H2452 et MSTO-221H à croître sans adhésion a été évaluée par un test de culture 3D (Nunclon sphera®), six jours après leur mise en culture, les sphères formées sont photographiées, dénombrées et leurs diamètres mesurés.

Comme l'illustre les caractéristiques des sphères présentées sur la [Figure 64](#), la capacité des lignées de MPM à se maintenir sans adhésion est indépendante de la présence ou de l'absence de RASSF1A dans ces cellules.

Ainsi, les cellules des lignées H2052 (avec méthylation de RASSF1A) et MSTO-211H (avec RASSF1A sauvage) sont peu affectées par l'absence d'adhésion et forment des sphères plus volumineuses et plus nombreuses (diamètre 3 à 6 fois plus grand) que les lignées H28 et H2452 exprimant ou n'exprimant pas RASSF1A respectivement ([Figure 64](#)).

Dans la lignée H2052, la ré-expression de RASSF1A diminue de 40% le nombre de sphères mais augmente leurs diamètres de près de 2 fois ($p < 0,05$) (ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett $n=3$) ([Figure 64](#)). Le plasmide RASSF1C n'a lui aucun effet significatif sur la croissance sans adhérence à un support.

Dans la lignée MSTO-211H, la perte d'expression de RASSF1A induite par transfection du siRASSF1A-1 augmente le nombre de sphères formées qui, cette fois, ont un diamètre plus petit que dans la condition contrôle (SiNeg) ($p < 0,05$) (ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett $n=3$).

Caractérisation des cellules

Modification transitoire de l'expression de RASSF1A

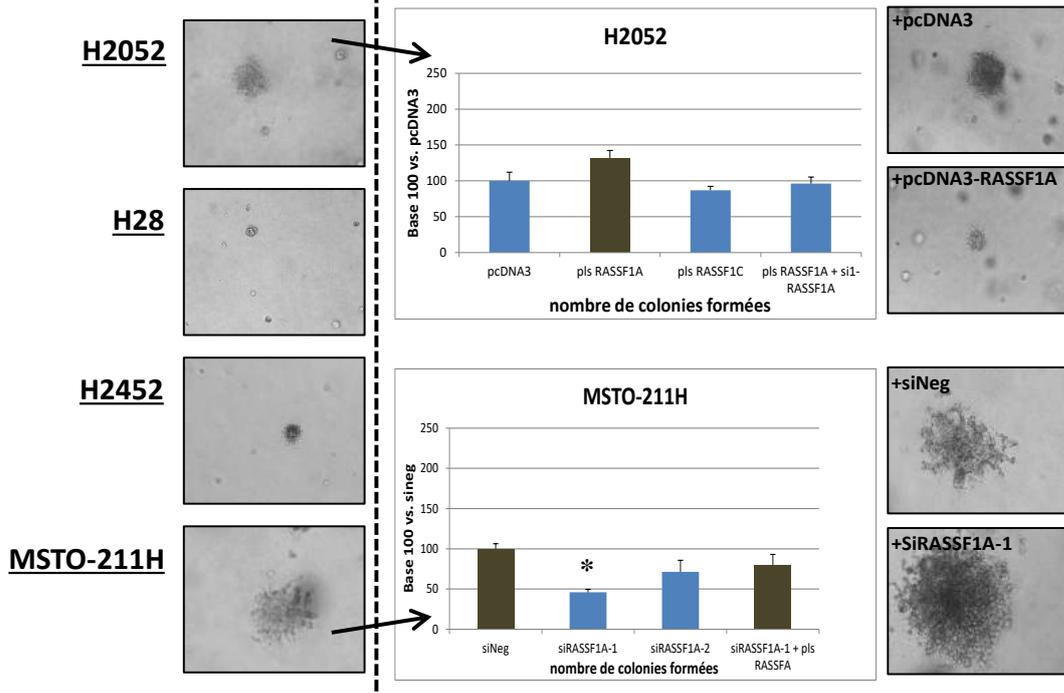


Figure 65 : Impact de la modification transitoire de RASSF1A sur la capacité des cellules de lignées mésothéliales à croître en agar.

Après avoir caractérisé la capacité des cellules des lignées mésothéliales à croître en agar, l'influence de la modification transitoire de l'expression de RASSF1A (ré-expression pour la lignée H2052, extinction pour la lignée MSTO-211H) sur ces modèles de cultures sans adhésion est testée (n=3, ANOVA suivi d'un test post-hoc de Dunnett, * vs. condition pcDNA3 (H2052) ou siNeg (MSTO-211H), * : p<0,05).

Enfin, la capacité des lignées H2052, H28, H2452 et MSTO-221H à former des colonies en agar a été évaluée, les cellules ont été maintenues en culture 21 jours afin de déterminer la cinétique d'apparition des colonies, et au terme du test, le nombre de colonies apparues ainsi que leurs tailles ont été mesurés (Figure 65). Les cellules de la lignée MSTO-211H sont les plus aptes à former des colonies en agar ; dès le 4^{ème} jour de test, les premières colonies sont visibles tandis que ce n'est qu'au 12^{ème} jour qu'apparaissent les premières colonies des lignées H2052 et H2452 et qu'au 19^{ème} jour pour les cellules de la lignée H28.

La ré-expression de RASSF1A ne modifie pas significativement le nombre de colonies formées par les cellules H2052, mais s'accompagne d'une diminution de leurs tailles par rapport au contrôle (pcDNA3) (Figure 65). Une nouvelle fois dans ce type de test, la transfection de RASSF1C est sans effet sur le nombre et la taille des colonies formées.

Dans les cellules de la lignée MSTO-211H, l'extinction de RASSF1A par le siRASSF1A-1 diminue significativement le nombre de colonies formées mais augmente fortement leurs tailles si bien que ces colonies convergent les unes vers les autres et établissent à l'issue du test un immense réseau tridimensionnel en l'agar (Figure 65).

Que ce soit pour le test de culture sphéroïde ou le test en agar, peu de variations ont été observées pour les lignées H28 et H2452 après modification transitoire de l'expression de RASSF1A probablement du fait de la faible adaptation de ces cellules à ce mode de culture sans adhésion (données non montrées).

Ces expériences de culture sans adhésion démontrent que la perte d'expression de RASSF1A favorise la dissémination et le développement des cellules de la lignée MSTO-211H.

Bien que n'expliquant pas à elle seule l'agressivité des cellules de lignées mésothéliales humaines tumorales, l'inactivation de RASSF1A rend les cellules de la lignée MSTO-211H encore plus aptes à envahir le Matrigel®, former des sphères en 3D et des colonies en agar. Cette approche a également permis d'établir un lien entre l'absence/présence de RASSF1A et les niveaux d'expression de deux molécules impliquées dans les processus angiogéniques, le CD44 et l'amphiréguline (AREG). Cette observation ne nous apparaît pas comme étant une simple coïncidence. Nous supposons en effet, que la surexpression de ces molécules soit le reflet d'un phénotype plus agressif des MPM et que de fait, ces molécules puissent être de nouveaux biomarqueurs pronostiques des MPM. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que ces deux molécules:

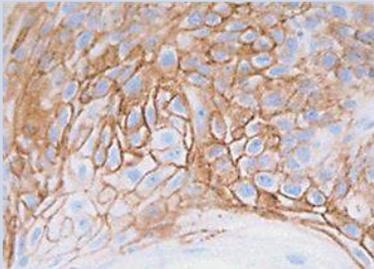
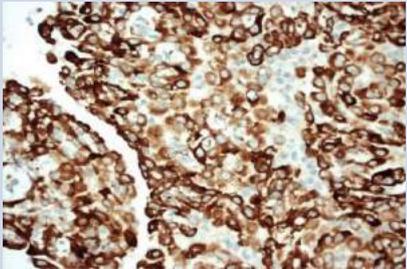
i) sont impliquées dans la voie de signalisation Hippo dont la perturbation est au cœur de la carcinogenèse pleurale (l'augmentation du CD44, décrit comme inhibiteur des kinases MST/LATS, doit permettre l'expression des gènes cibles de YAP, dont l'AREG, expression que ne devrait pas avoir lieu dans une cellule normalement différenciée).

ii) sont toutes deux associées à un phénotype invasif/prolifératif et chimiorésistant des cellules tumorales. En effet, le CD44 est le principal récepteur de l'acide hyaluronique (AH), un glycosaminoglycane en abondante quantité dans la cavité pleurale, permettant notamment aux deux feuillets de la plèvre de glisser l'un sur l'autre durant la respiration. Lié à l'AH, le CD44 peut i) modifier la cytoarchitecture en interagissant avec l'ankyrine, ii) activer des RhoGTPases telles que RhoA ou Rac1 en recrutant leurs GEF respectives, iii) faciliter la signalisation des récepteurs à activités tyrosine kinases tels que l'EGF-R ou HER2 notamment en renforçant la liaison de ces récepteurs à leur ligand, EGF ou AREG dans le cas de l'EGF-R (pour revue : (Williams *et al.*, 2013)).

Toutes ces interactions permettent au CD44 d'influencer la prolifération et la migration des cellules tumorales. L'interaction CD44/AH pourrait également contribuer à la chimiorésistance des cellules tumorales car cette interaction stimule l'expression de MDR1 (Misra *et al.*, 2005) ou MRP2 (Ohashi *et al.*, 2007), deux transporteurs ABC expulsant les substances cytotoxiques, dont les traitements anti-cancéreux, hors des cellules.

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons voulu savoir si le CD44 et l'AREG sont de nouveaux biomarqueurs des MPM.

Tableau 13 : Protocole des IHC pour l'analyse du marquage du CD44 et de l'AREG des patients inclus dans l'essai clinique MAPS.

	CD44	AREG
prétraitement	pH6 - 20 min au bain-marie	pH6 - 20 min au bain-marie
Blocage des sites non spécifique	T-TBS-5% BSA-30 min	T-TBS-5% BSA-60 min
Anticorps primaire	lapin monoclonal Dilution : 1/8000 ^{ème} Incubation 40 min à température ambiante	chèvre polyclonal Dilution : 1/100 ^{ème} Incubation sur la nuit à 4°C
Révéléateur	Kit Envision (Dako®)	Kit Anti-Goat HRP-DAB Cell (R&D®)
marquage	Membranaire	Nucléaire/nucléolaire et/ou cytosolique
Témoin interne	Cellules basales de l'épithélium	les nerfs
Exemple d'immuno-marquage		
Nombre de cas testé	335/448	288/448
Médiane	60	70
1^{er} quartile	20	30
3^{ème} quartile	180	80
Moyenne	97,30	59,87

III. Impact de l'expression du CD44 et l'amphiréguline chez les patients atteints de MPM et inclus dans l'essai MAPS

Afin de déterminer le possible rôle de biomarqueur du CD44 standard et de l'AREG chez les patients atteints de MPM, nous avons réalisé des immunomarquages de ces cibles sur les 335 prélèvements tumoraux des patients inclus dans MAPS pour lesquels nous avons du matériel, selon la procédure décrite pour les IHC de YAP et TAZ, les spécificités des IHC pour le CD44 et l'AREG sont décrites Tableau 13.

III.A. Le CD44 standard est un outil diagnostique du MPM

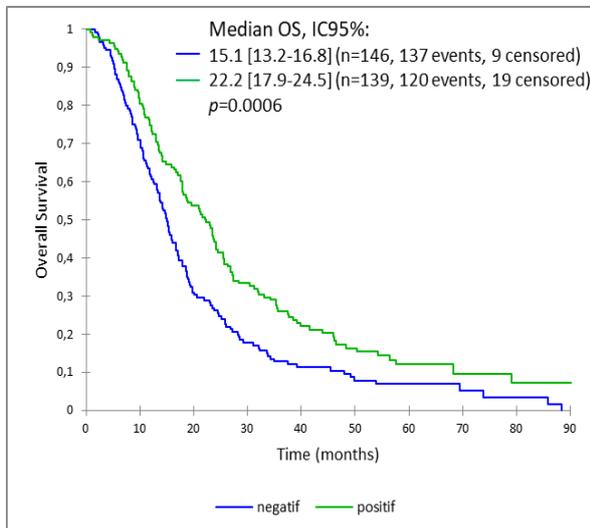
L'expression du CD44 standard (CD44s) a pu être quantifiée pour 335/448 patients atteints de MPM inclus dans MAPS (72,5% des cas). Le score moyen de ce marquage est de 97,3+/-99,3 et la médiane de 60. Le marquage du CD44 standard est membranaire, en cadre complet, il était observé à la fois sur les cellules tumorales et les cellules stromales. Alors que le CD44 est un facteur de mauvais pronostic dans plusieurs tumeurs, incluant le cancer du sein (Dan *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2016), colorectal (Huh *et al.*, 2009; Jing *et al.*, 2015), gastrique (Chen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015b), rénal (Li *et al.*, 2015a), de la langue (Lindquist *et al.*, 2012), ou encore du larynx (Esteban *et al.*, 2005), la corrélation des scores du CD44 standard aux données cliniques des patients inclus dans MAPS révèle que son expression n'influence ni la survie globale ni la survie sans progression des patients atteints d'un MPM (données non montrées, p=0,49 et 0,44 respectivement). Cette absence d'influence du CD44 sur la survie des patients atteints de MPM est en accord avec une étude récente (Cortes-Dericks et Schmid, 2017).

Ainsi, dans le MPM, le CD44s est donc un outil diagnostique mais non pronostique ou prédictif.

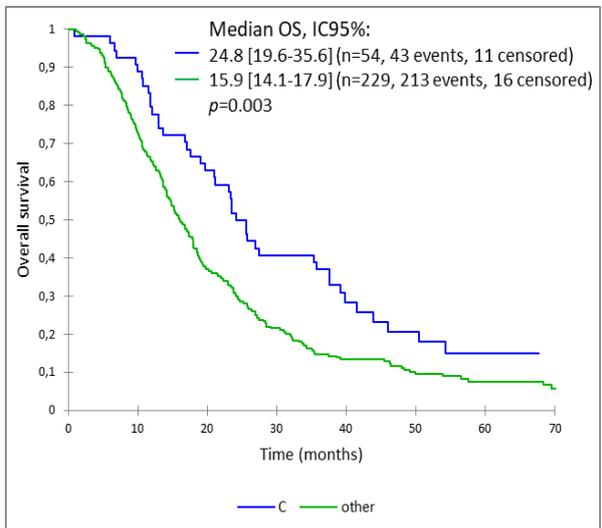
Expression de l'AREG

Localisation subcellulaire de l'AREG

Survie Global

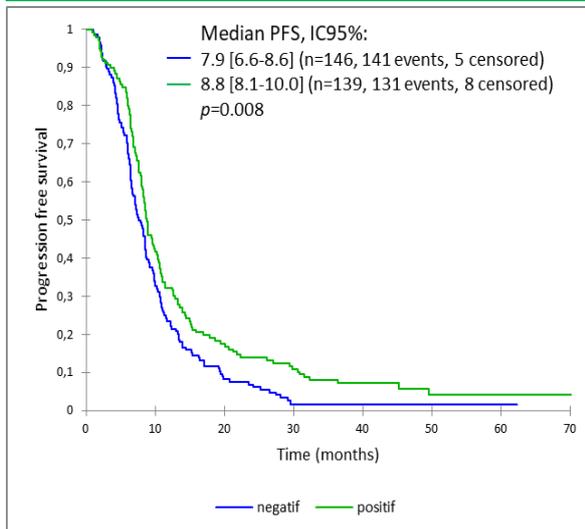


HR= 0,65 [0,51-0,83], $p=0,0006$
Adj HR = 0,70 [0,54-0,90], $p=0,005$

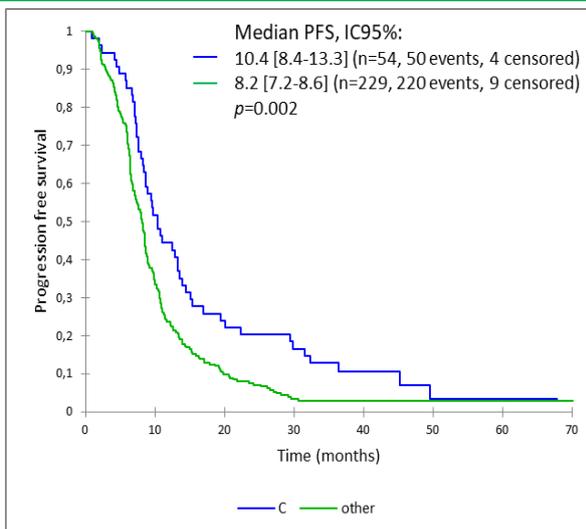


HR= 0,61 [0,441-0,84], $p=0,003$
Adj HR = 0,62 [0,44-0,86], $p=0,005$

Survie sans progression



HR= 0,72 [0,57-0,92], $p=0,008$
Adj HR = 0,70 [0,55-0,90], $p=0,006$



HR= 0,61 [0,45-0,84], $p=0,002$
Adj HR = 0,58 [0,42-0,79], $p=0,0007$

Figure 66 : Médiane de survie globale (OS) et sans progression (PFS) des patients avec un marquage AREG négatif versus AREG positif ou selon la localisation du marquage de l'AREG cytosolique (C) versus autres localisations (other).

Adj HR :Ajustement sur le sexe, l'âge, l'histologie, le PS, l'hémoglobine, les globules blancs, et les plaquettes.

III.B. L'expression de l'Amphiréguline prédit une meilleure survie globale et survie sans progression des patients atteints de MPM

L'expression de l'AREG a pu être quantifiée pour 288/448 patients atteints de MPM et inclus dans l'essai MAPS (soit 64,3% des cas). Pour 3 patients, l'IHC était non interprétable. Le marquage de l'AREG est principalement cytoplasmique et/ou nucléaire. Certains prélèvements montraient également un immunomarquage nucléolaire. Cette observation d'un marquage nucléolaire avait déjà été décrite dans des cellules de carcinome ovarien sans que la significativité de ce marquage n'ait été discutée (Johnson *et al.*, 1991). Enfin, aucun cadre cellulaire n'est apparu immunomarké, de même, la MEC n'était pas une cible de l'anticorps.

Le score moyen de l'AREG est de 59,87+/-26,92, la médiane de 70. L'expression de l'AREG s'est révélée être un facteur de bon pronostic : les patients dont la tumeur exprime l'AREG ont une médiane de survie globale de 22,2 mois contre 15,1 mois pour les patients dont la tumeur n'exprime pas l'AREG (p=0,0006 en analyse univariée et p=0,005 en multivariée). De la même façon, la médiane de survie sans progression est meilleure chez les patients AREG positif, 8,8 mois *versus* 7,9 mois chez les patients négatif (p=0,008 en analyse univariée) (Figure 66).

La localisation subcellulaire de l'AREG constitue elle aussi un facteur pronostique : la médiane de survie globale des patients exprimant une AREG cytosolique est de 24,8 mois *versus* 15,9 mois lorsque l'AREG est dans un autre compartiment cellulaire (HR : 0,62, 95%IC [0,44-0,86], p=0,005 en analyse multivariée). Enfin, la médiane de survie sans progression des patients exprimant une AREG cytosolique est 10,4 mois *versus* 8,2 mois pour les autres localisations subcellulaires (HR : 0,61, 95%IC [0,45-0,84], p=0,002 en analyse univariée, p=0,0007 en analyse multivariée) (Figure 66).

L'AREG a également pu être dosée dans le sang chez 373/448 patients atteints de MPM et inclus dans MAPS (83,3% des cas). De façon surprenante, puisque la plupart des tumeurs de MPM analysées expriment de l'AREG en forte quantité, l'AREG sérique n'a été décelée que chez 42 des 373 patients pour lesquels le dosage a pu être effectué. Le score sérique moyen de l'AREG est de 48,24+/-455,1, la médiane de 0. Contrairement au marquage tissulaire, le taux d'AREG dans le sang n'influence pas significativement la survie globale ni sans progression des patients atteints de MPM.

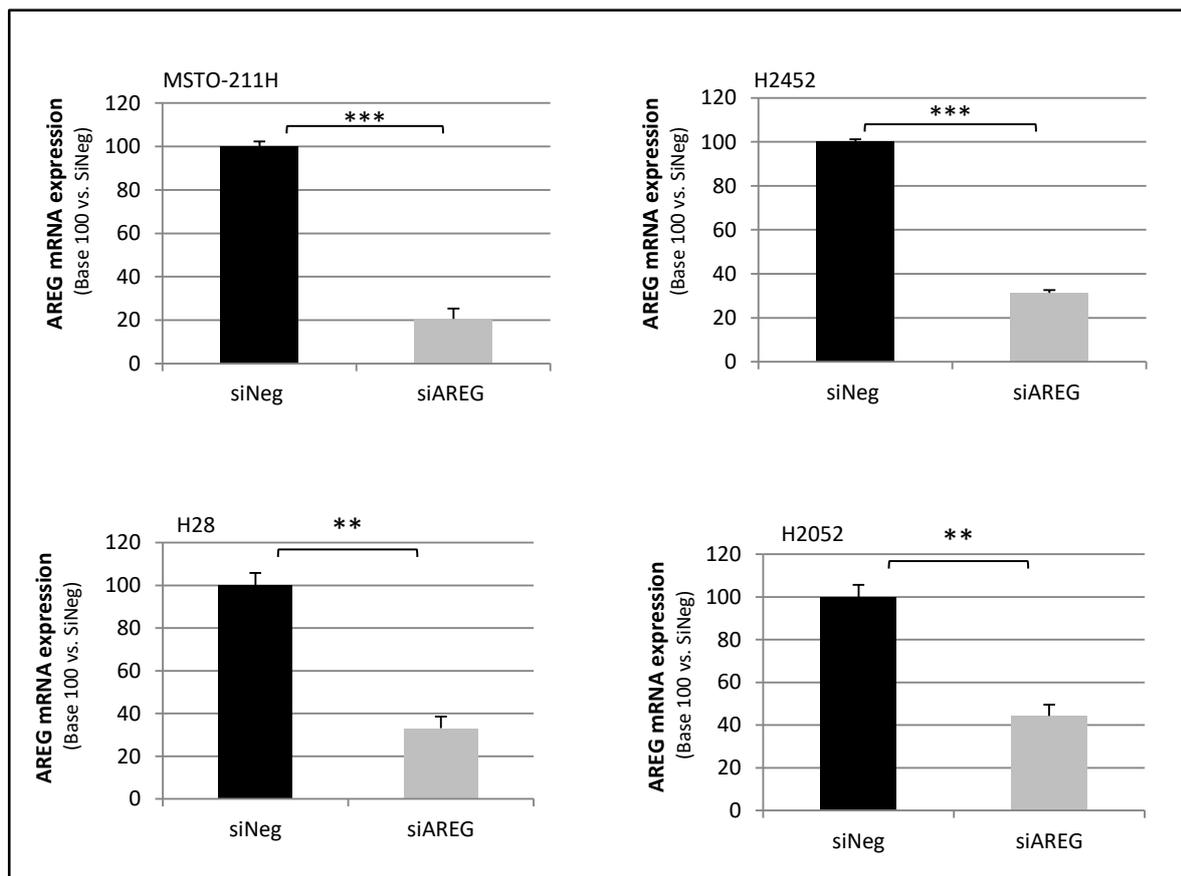


Figure 67 : Extinction de l'AREG par transfection par siARN dans les lignées MSTO-211H, H2452, H28 et H2052.

Les cellules sont ensemencées dans du milieu RPMI/L glutamine-10% SVF puis transfectées, après avoir atteint 50% de confluence, avec le siAREG à une concentration de 40nM. La transfection est arrêtée après 48h puis les ARN sont extraits et amplifiés par RT-qPCR (n=3, t-Test, * vs. Condition siNeg: **: p<0,01, ***: p<0,001).

De façon surprenante, aucune corrélation entre les dosages sériques et les quantités tissulaires de l'AREG n'a été trouvée (coefficient de corrélation=0,007, p=0,91).

Enfin, l'AREG ne permet pas de prédire la réponse des patients aux traitements administrés dans ce protocole clinique.

L'expression de l'AREG et d'autant plus lorsqu'elle est cytosolique prédit donc une meilleure survie des patients atteints de MPM. Au vu de ces résultats qui semblaient contradictoires aux données de la littérature, nous avons voulu tester dans des lignées cellulaires mésothéliales humaines (MSTO-211H, H2452, H2052 et H28), l'effet de l'extinction de l'AREG sur l'invasion/métastase, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

➤ Mises au point de l'extinction de l'AREG

Nous avons au préalable déterminé la concentration adéquate en siAREG dans quatre lignées cellulaires mésothéliales (MSTO-211H, H2452, H28 et H2052). Les extinctions ont été réalisées de la même façon que pour le siMST1, en transfectant les avec le kit JetPIME™ (Ozyme®). En parallèle, nous avons effectué une transfection de siARN « Négatif », servant de contrôle de transfection, afin de s'assurer que les effets observés ne sont imputables qu'à l'extinction du gène souhaité

La mise au point des transfections au moyen d'un siAREG a permis de retenir la concentration de 40 nM, cette concentration permet une diminution de l'expression du messager de l'AREG de 60 à 80% selon les lignées cellulaires (Figure 67).

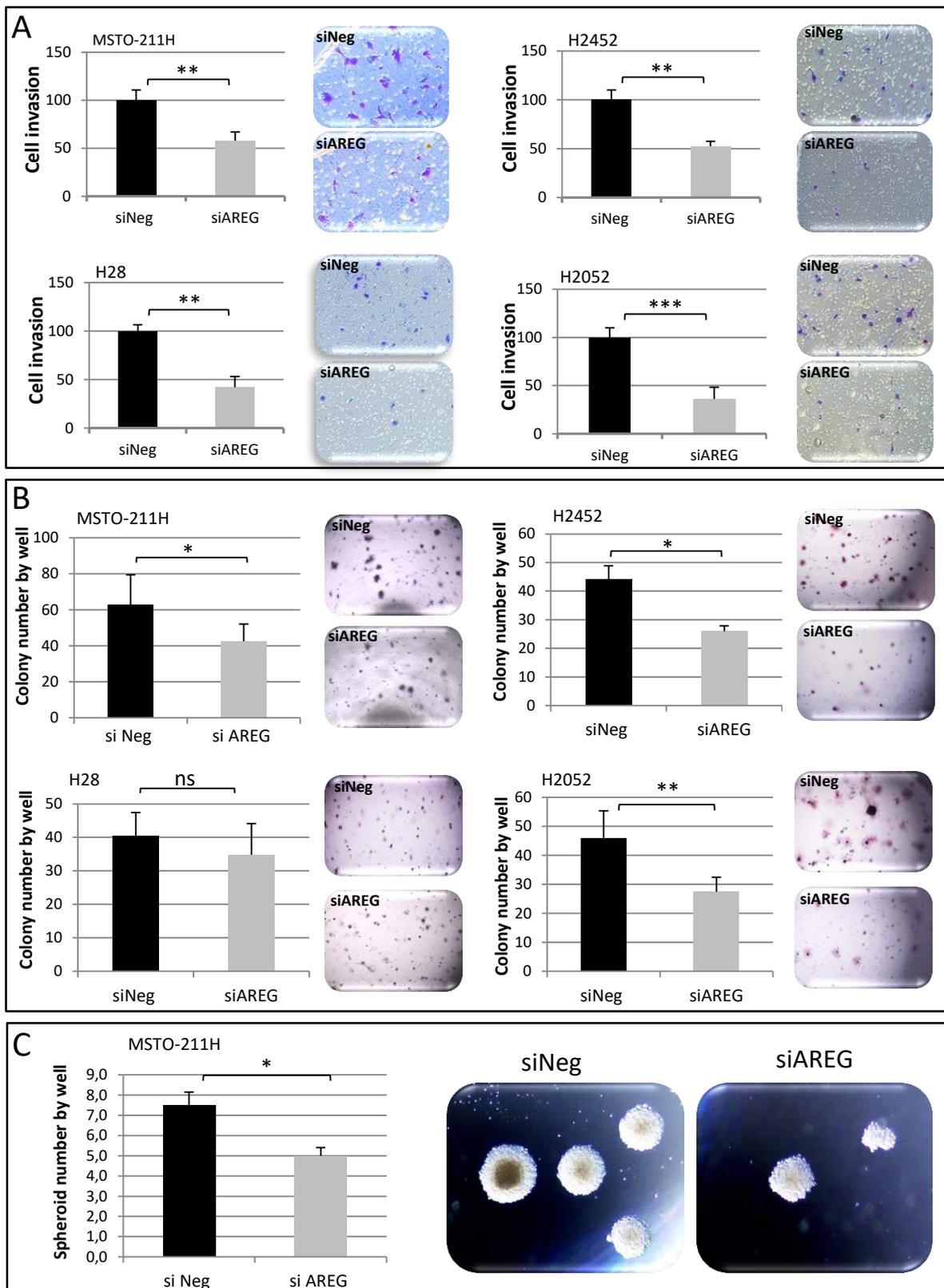


Figure 68 : Capacité des lignées de MPM à envahir une membrane de Matrigel (Invasion), croître en agar et en suspension.

Les cellules sontensemencées 24h après la transfection dans **A**) une chambre de Boyden, les cellules de la face externe sont colorées au crystal violet et comptées après 48h, **B**) en agar, après 21 jours les colonies formées sont comptées et **C**) en culture sans adhésion pour les MSTO-211H (sphéroïde), comptées 6 jours après l'ensemencement (n=3, t-Test, * vs. Condition siNeg: ns: non significatif, *: p<0,05, **: p<0,01, ***: p<0,001).

➤ **Impact de l'extinction de l'AREG *in cell***

Nous montrons que l'inactivation de l'AREG diminue significativement i) la capacité d'invasion des cellules des quatre lignées mésothéliales étudiées ici, comparées aux cellules exprimant l'AREG ($p < 0,001$ pour les H2052 et $p < 0,01$ pour les trois autres) ii) la croissance en agar pour 3 de ces lignées et iii) la croissance en suspension montrée ici pour la lignée MSTO-211H (Figure 68).

A l'inverse, l'inactivation de l'AREG dans les cellules de lignées mésothéliales s'accompagne d'une augmentation de l'apoptose ($p < 0,01$) ainsi que d'une diminution de la prolifération cellulaire (significative pour trois des modèles étudiés ($p < 0,05$: H2452, H28 et $p < 0,01$: H2052) et avec une forte tendance pour la lignée MSTO-211H) (Figure 69).

Nous avons également testé, l'influence d'AREG recombinante exogène sur la capacité des cellules à envahir une membrane de Matrigel, ces premiers résultats sont préliminaires ($n=2$) et réalisés dans deux lignées cellulaires (MSTO-211H et H2452). Les premières analyses suggèrent que l'AREG exogène augmente la capacité invasive des cellules mésothéliales et que cet effet est perdu en ajoutant le siAREG. Ce qui permet de nous assurer de la spécificité de notre extinction et de l'impact de l'AREG dans des lignées mésothéliales.

Ces résultats laissent penser, dans des lignées mésothéliales humaines, que l'AREG est pro-invasive en augmentant à la fois l'invasion/métastase, la prolifération et en diminuant l'apoptose, ce qui n'avait pas encore été montré dans ce type cellulaire. Néanmoins, ces données sont en accord avec la littérature sur le rôle physiologique de l'AREG connue pour moduler la prolifération cellulaire, l'apoptose et la migration. De plus, dans le MPM, des auteurs montrent que l'AREG stimule l'invasion (Liu et Klominek, 2004) et que les cellules de MPM expriment davantage d'AREG par rapport aux cellules mésothéliales saines (Cesario *et al.*, 2005) suggérant une activation excessive de l'EGFR qui contribue à l'agressivité du mésothéliome. Ces données et nos résultats dans les lignées mésothéliales confortent le rôle probable de l'AREG dans la carcinogenèse pleurale mais sont néanmoins en contradiction avec la valeur pronostique retrouvée dans l'essai MAPS.

Pour expliquer ces apparentes contradictions entre les résultats cliniques et les résultats obtenus *in cell* nous émettons l'hypothèse que la forme d'AREG quantifiée dans les prélèvements des patients atteints de MPM n'est peut-être pas la forme mature de la protéine mais son précurseur.

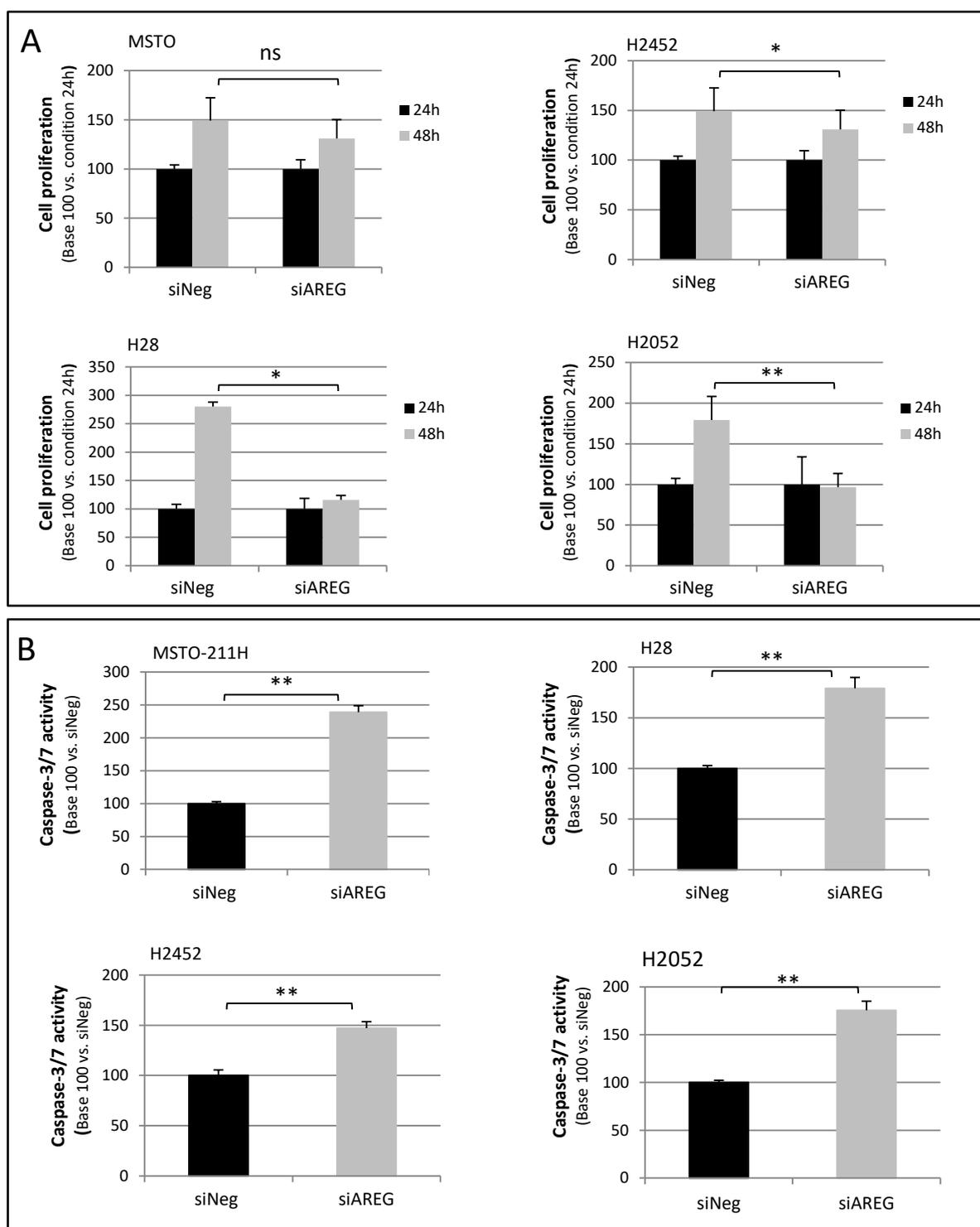


Figure 69 : Capacité des lignées de MPM à proliférer et à induire l'apoptose.

Les cellules sontensemencées, transfectées après 24h puis **A**) la prolifération cellulaire est quantifiée par le test d'incorporation du BrdU après 24h et 48h post-transfection et **B**) la capacité apoptotique est mesurée par le test caspase3/7, 48h après la transfection (n=3, t-Test, * vs. Condition siNeg: ns: non significatif, *: p<0,05, **: p<0,01).

Pour rappel, le pro-AREG a besoin d'être clivé par les TACE pour être sous sa forme mature et soluble, appelé alors AREG, et exercer ses fonctions biologiques *via* sa fixation à l'EGFR.

L'anticorps utilisé pour quantifier l'expression d'AREG chez les patients de l'essai MAPS reconnaît à la fois la forme clivée et le précurseur de l'AREG : cet anticorps polyclonal reconnaît en effet un épitope allant du résidu Valine 107 au résidu Lysine 184, présent sur les deux formes de l'AREG. Lorsqu'un tissu est immunomarcqué, nous ne pouvons dire si cette AREG est bien clivée, fonctionnelle et sera alors libérée vers le stroma.

Seul le ciblage exclusif de l'AREG mature permettrait de répondre à la question de maturation de cette protéine mais de tels outils n'existent pas. Si l'AREG reconnue n'est pas mature et s'accumule dans le cytoplasme sans pouvoir être relarguée dans le stroma et par conséquent n'assure pas ses fonctions biologiques, le taux élevée d'AREG chez les patients atteints de MPM ne reflète alors pas sa fonction pro-invasive. Le meilleur pronostic des patients qui expriment l'AREG, peut éventuellement s'expliquer par le fait que cette AREG n'est pas clivée et par conséquent non excrétée, ne pouvant pas assurer ses fonctions.

Quels sont les arguments en faveur de l'hypothèse que l'AREG s'accumulerait sous forme inactive et/ou qu'il y aurait un dysfonctionnement dans son processus de maturation ?

1. dans l'essai MAPS, les patients pour lesquels les prélèvements tumoraux sont positifs pour l'AREG, ne sont pas ceux pour lesquels de l'AREG circulant dans le sang a pu être dosée (absence de corrélation), et à l'inverse, les patients chez lesquels de l'AREG sérique a été décelée sont des patients dont les tumeurs sont AREG négatives.
2. Il faut noter que dans le surnageant des différentes lignées cellulaires à notre disposition, nous ne retrouvons que d'infimes quantités d'AREG sécrétées (Test Elisa) tandis que le niveau du messenger dans ces cellules est important, pouvant laisser penser que dans le MPM, il existe peut-être un blocage du clivage de l'AREG via une mutation ou par d'autres régulateurs (TIMPs) ciblant les sites de clivage des TACE ou les TACE elles-mêmes.

Comment pourrions-nous expliquer que l'AREG s'accumule sous une forme inactive dans les cellules mésothéliales tumorales ?

1. La protéine de clivage TACE pourrait être inactive dans les cellules de MPM causant une accumulation de la forme pro-AREG. La TACE « ADAM17 » est réprimée au niveau post-transcriptionnel par le miR-145 (Wu *et al.*, 2015a). Or, ce miR semble diminué dans le MPM (Andersen *et al.*, 2014; Cioce *et al.*, 2014; Santi *et al.*, 2017), il est donc peu probable que la TACE soit moins exprimée dans les cellules mésothéliales tumorales.

En revanche, il a été démontré que la mutation de Cys600 de l'ADAM17 entraîne une perte d'activité de l'enzyme (Li et Fan, 2004). Cette mutation n'a pas été recherchée dans des prélèvements de MPM mais pourrait engendrer l'inactivation de l'ADAM17. De la même façon, l'activité d'ADAM17 est influencée par l'environnement ionique. *In vivo*, la métalloendopeptidase NRDC (*N*-arginine dibasic convertase) protège ADAM17 de l'activité inhibitrice du NaCl et potentialise son activité catalytique (Nishi *et al.*, 2006). La NRDC et ou l'environnement ionique pourraient être altérés dans le MPM. Enfin, la maturation d'ADAM, par clivage de son propeptide, est effectuée par des pro-protéines convertases (PC), telles que la furine (Murphy, 2009). Ces PC pourraient être altérées dans le MPM.

2. Le pro-AREG pourrait ne pas être accessible à la TACE : encapsulé dans des vésicules d'endocytose, le pro-AREG ne peut subir le clivage par les ADAMs entraînant une réduction de la sécrétion d'AREG soluble (Fukuda *et al.*, 2012). Cette endocytose est favorisée par des stress cellulaires dont pourrait faire partie l'exposition des cellules aux fibres d'amiante.

Ainsi, devant le peu de données disponibles dans la littérature sur l'AREG et le MPM, nous ne pouvons à ce stade que formuler des hypothèses pour expliquer pourquoi l'expression d'AREG cytosolique des cellules tumorales mésothéliales est un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de MPM. Ces hypothèses sont autant de perspectives pour la suite de ce travail, il serait par exemple, intéressant de vérifier nos théories :

- par zymographie pour évaluer l'activité des TACE (en ajoutant de l'AREG exogène pour vérifier que celle-ci est bien clivée).
- en recherchant la mutation Cys600 dans nos lignées mésothéliales (par pyroséquençage). Les blocs étant épuisés dans la collection MAPS nous ne pourrions pas réaliser ce travail au niveau clinique.
- ou encore quantifier l'expression des NRDC et des PC.

Discussion Générale

Ce travail de thèse s'inscrivait dans une dynamique visant à mieux comprendre l'histoire naturelle du MPM et identifier de nouveaux outils diagnostiques, pronostiques et/ou prédictifs du MPM, voire de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. A son début, bien que certaines anomalies récurrentes dans le MPM étaient déjà répertoriées, les mécanismes de la carcinogenèse pleurale étaient encore peu compris.

Pour améliorer ces connaissances, nous avons souhaité caractériser les anomalies moléculaires affectant en particulier, l'expression des membres de la voie de signalisation RASSF/Hippo dans les prélèvements tumoraux des 448 patients atteints de MPM enrôlés dans l'essai clinique MAPS (IFCT-GFPC 0701), essai ayant démontré le bénéfice de l'association du Bevacizumab au doublet de référence Pemetrexed-Cisplatine (Zalcman *et al.*, 2016). Nous savions que cette voie de signalisation était perturbée dans le MPM, notamment parce que, parmi les quelques anomalies récurrentes du MPM figuraient des mutations de NF2 (Bianchi *et al.*, 1995; Bueno *et al.*, 2016; De Rienzo *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2015; Lo Iacono *et al.*, 2015), l'un des régulateurs de cette voie, mais les anomalies de cette voie n'étaient alors pas clairement répertoriées et leur implication dans le MPM n'étaient pas forcément bien comprises. Nous avons ainsi établi une cartographie précise des anomalies de la voie RASSF/Hippo dans le MPM et démontré, en accord avec d'autres travaux publiés depuis (Bueno *et al.*, 2016; De Rienzo *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2015; Lo Iacono *et al.*, 2015; Miyanaga *et al.*, 2015), que cette voie est fréquemment et sévèrement affectée dans ce type rare de cancer.

Parmi les altérations de cette voie que nous rapportons, nous avons pu de plus démontrer que certaines sont des événements « clé » (inactivation de la kinase MST1) tandis que d'autres sont des événements « aggravants » (inactivation de la protéine d'échafaudage RASSF1A) au cours de la carcinogenèse pleurale.

Nous rapportons en effet que le promoteur du gène de la kinase MST1 est fréquemment méthylé chez les patients atteints de MPM et que l'inactivation de l'expression de cette kinase est un facteur de mauvais pronostics (Maille *et al.*, article en préparation).

Le promoteur du gène RASSF1A est quant à lui peu fréquemment méthylé chez les patients atteints de MPM et, en tous cas, sans influence sur la survie des patients atteints de MPM. Toutefois, l'inactivation de l'expression de RASSF1A au moyen d'ARN interférent dans des cellules de lignées humaines mésothéliales les rend « plus agressives », les cellules étant davantage capables d'envahir du Matrigel ou encore de croître sans adhésion.

L'influence de l'inactivation de MST1 sur la survie de patients atteints de cancers du sein, foie et colorectal avait déjà été rapportée dans la littérature (Lin *et al.*, 2013; Minoo *et al.*, 2007; Sohn *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017) mais jamais dans le MPM. A l'inverse, dans la littérature, la fréquence (environ 25%) de la perte d'expression de RASSF1A suite à la méthylation du promoteur de son gène avait déjà été rapportée chez des patients atteints de MPM (Destro *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2012) tandis qu'ici nous ne retrouvons qu'une fréquence très faible de la perte d'expression de RASSF1A par méthylation de son promoteur (11,1%). Ces différences s'expliquent probablement par une différence du nombre de patients inclus dans les cohortes étudiées, du mode de recrutement de ces patients, et confirment l'intérêt de ces larges essais cliniques qui par leur sélection stricte des patients et la taille des cohortes permettent de générer des données a priori plus fiables.

On ne peut cependant totalement exclure des différences techniques dans la détermination du statut de méthylation, bien que notre expérience dans les CBNPC (Dubois *et al.*, 2016) n'avait pas montré, avec la même technique, des résultats très différents de ceux de la littérature dans le cancer du poumon de stade précoce.

Aucune des anomalies moléculaires que nous avons rapportées chez les patients atteints de MPM n'est exclusive l'une de l'autre, ainsi un même prélèvement tumoral peut porter plusieurs altérations de cette voie de signalisation RASSF/Hippo. Cette accumulation d'anomalies moléculaires affectant la voie de signalisation RASSF/Hippo se retrouve dans les modèles cellulaires d'étude du MPM. Dans ces cellules, plus il y a d'anomalies de la voie RASSF/Hippo plus le comportement cellulaire semble « agressif ».

Ainsi les lignées MSTO-211H et H2052 qui sont respectivement de phénotype biphasique et sarcomatoïde, sont les cellules les plus aptes à croître sans adhésion ou envahir une matrice de type Matrigel®, or ce sont aussi les cellules qui présentent le plus de points de perturbation de la voie de signalisation RASSF/Hippo (ce qui constitue une constatation mais en rien une preuve de causalité).

YAP est l'effecteur de la voie Hippo impliqué dans la carcinogenèse pleurale

Alors que YAP/TAZ sont souvent présentés comme des co-facteurs transcriptionnels interchangeables dans de nombreuses études, en partie du fait de l'utilisation d'anticorps ne permettant pas toujours de les distinguer, nous montrons que seul YAP est impliqué dans la carcinogenèse pleurale, ce qui est en accord avec une étude rapportant que YAP est activé dans 70% de cas de MPM (Zhang *et al.*, 2017).

Dans notre travail, le mauvais pronostic des patients atteints de MPM et présentant une méthylation de MST1 s'explique par l'acquisition d'un phénotype agressif des cellules mésothéliales qui est corrélé à une accumulation nucléaire de YAP a priori actif et une rétention cytoplasmique de TAZ. Ce paradoxe entre YAP et TAZ se retrouve également lors de la perte d'expression de RASSF1A dans les cellules mésothéliales qui renforce leur agressivité et s'accompagne d'un YAP qui s'accumule dans le noyau sous sa forme active alors que TAZ est lui diminué.

De plus, de façon originale, nous rapportons que les cellules de lignées de MPM expriment YAP ou TAZ en abondance mais rarement les 2 paralogues en quantité équivalente, et nous observons une augmentation de l'expression de YAP lorsque TAZ est inactivé et inversement, suggérant une régulation négative de l'un des effecteurs terminaux de la voie Hippo sur l'autre. En accord avec cette hypothèse, des auteurs ont récemment montré que YAP exerce une régulation négative sur l'accumulation protéique de TAZ et inversement (Finch-Edmondson *et al.*, 2016; Moroishi *et al.*, 2015), par un mécanisme post-transcriptionnel requérant TEAD (Moroishi *et al.*, 2015). Ainsi, les hépatocytes et entérocytes de souris knock-out pour YAP présentent une augmentation importante de l'expression de TAZ nucléaire (Moroishi *et al.*, 2015). La perte d'expression de YAP dans les cellules mammaires immortalisées (shRNA), induit une augmentation de TAZ et à l'inverse la surexpression de YAP dans ces cellules montre une diminution de l'expression de TAZ. (Moroishi *et al.*, 2015).

Les résultats rapportés par notre équipe confirment ce qui était pressenti dans la littérature depuis quelques années à savoir que YAP et TAZ sont en réalité de "faux jumeaux", ayant des fonctions communes puisqu'ils partagent des co-facteurs de transcription identiques, mais aussi des fonctions propres, via leurs partenaires spécifiques (Guo et Teng, 2015; Kaan *et al.*, 2017a; Zhu *et al.*, 2015a).

Implication de l'axe CD44/RASSF1A/MST1/YAP/AREG dans la carcinogenèse pleurale

Nos résultats identifient l'implication d'un "axe" CD44/RASSF1A/MST1/YAP/AREG dans la carcinogenèse pleurale et en particulier dans l'apparition d'un phénotype plus agressif des cellules mésothéliales tumorales. Cette constatation nouvelle révèle de nouveaux biomarqueurs du MPM.

Bien que l'expression du CD44 n'influence pas la survie des patients atteints de MPM, nous savons que ce marqueur est induit par les altérations de la voie RASSF1A/Hippo.

D'une part parce que la transcription du CD44 est induite par c-jun, et que c-jun est réprimé en présence de RASSF1A (Whang *et al.*, 2005), d'autre part parce que l'expression du CD44 est corrélée à l'activité de YAP : le complexe YAP/TEAD active la transcription du CD44 et favorise ainsi l'expression de propriétés similaires aux cellules souches cancéreuses (CSC) dans les cellules mésothéliales (Tanaka *et al.*, 2017). Les propriétés de type CSC sont inhibées par les statines via la voie du mévalonate qui régule la phosphorylation de YAP via RhoA ou B/F-Actine.

De plus, le CD44 peut réguler la phosphorylation de NF2 en fonction de la densité cellulaire et promeut séquentiellement l'expression de YAP, suggérant que CD44 joue deux rôles fonctionnels pivot en tant que suppresseur, en amont de la voie Hippo et en aval des cibles régulées par YAP/TEAD, compatible avec une boucle de rétro-contrôle positive entre YAP et CD44 (Tanaka *et al.*, 2017). Les statines ont permis d'identifier une cible préférentielle contre le mésothéliome en inactivant YAP et des inhibiteurs plus puissants de YAP sont en cours de développement dans un but thérapeutique, notamment des inhibiteurs de l'interaction YAP/TEAD.

Un deuxième aspect important de nos travaux est la révélation de la régulation positive de YAP sur CD44 (avec une expression plus élevée de CD44 associée à des taux plus élevés de gènes cibles de YAP), cliniquement associée à une malignité histologique (biphasique/sarcomatoïde) et à un pronostic plus sombre chez les patients atteints de MPM. Cependant, cette constatation est à prendre avec prudence car elle a été effectuée chez seulement 86 patients et à partir de données TCGA (Tanaka *et al.*, 2017). A l'échelle cellulaire, les cellules mésothéliales avec des mutations NF2 et/ou LATS2 avaient tendance à avoir une expression plus élevée de l'ARNm CD44, en comparaison à celles sans mutations NF2 ou LATS2 (Tanaka *et al.*, 2017), ces résultats montrent encore l'importance des altérations moléculaires et de leur accumulation dans l'agressivité du MPM.

Ces données de la littérature sont cohérentes avec nos résultats. En effet nous montrons que l'expression du CD44 est corrélée négativement à celle de RASSF1A, se traduisant par une augmentation de l'invasion et s'accompagne de l'activation de YAP (translocation nucléaire et augmentation de l'expression des gènes cibles (cf résultats partie II).

De plus, deux autres travaux de la littérature démontrent dans les cellules de la lignée MSTO-211H (Nuvoli *et al.*, 2014) ou dans d'autres lignées de MPM (ACC-MESO-1 et K921MSO (Hanagiri *et al.*, 2012)) que la perte d'expression du CD44 standard par siARN s'accompagne d'une diminution de l'invasion cellulaire.

Le CD44 promeut l'adhésion des cellules mésothéliales à l'acide hyaluronique, or cette liaison favoriserait la prolifération cellulaire et l'invasion (Hanagiri *et al.*, 2012).

Ces données suggèrent que l'interaction entre la voie métabolique du mévalonate et la signalisation Hippo est associée à l'induction de propriétés de type CSC corrélées à l'expression du CD44, pouvant conduire à une chimiorésistance et, en tous cas, à un mauvais pronostic (Tanaka *et al.*, 2017). Ainsi les patients atteints d'un mésothéliome avec une expression plus élevée des gènes cibles de YAP semblent davantage résistants aux chimiothérapies conventionnelles et constituent un sous-type de tumeur plus agressive car dotées de propriétés similaires à celles de CSC.

Quelles cibles thérapeutiques sont à envisager chez les patients atteints de MPM ?

L'altération de la voie de signalisation Hippo/RASSF est donc un évènement clé de la carcinogenèse pleurale (Miyanaga *et al.*, 2015; Sekido, 2011; Tranchant *et al.*, 2017; Maille *et al.*, article en préparation). Restaurer le bon fonctionnement de cette voie de signalisation et contrôler l'activité de YAP pourraient permettre d'endiguer la progression du MPM.

Plusieurs stratégies peuvent être envisagées :

- **Augmenter l'activité de MST2** ou **des kinases NDR** en aval de la kinase MST1 afin de restaurer le contrôle de l'activité de YAP : des agonistes de la voie Hippo sont en cours de développement tels que C19 ou GGTI-298, ils induisent la phosphorylation à la fois de MST1/2 et de LATS1/2, et augmentent les taux cytoplasmiques de YAP et la dégradation de TAZ (Johnson et Halder, 2014; Mi *et al.*, 2015). *In vitro* et *in vivo*, C19 parvient à inhiber la croissance des cellules de mélanome (Basu *et al.*, 2014).
- **Inactiver YAP** :
 - En inhibant l'interaction de YAP avec TEAD (inhibiteurs plus puissants que la vertéporfine, protoporphyrine, dasatinib ou encore les peptides VGLL4 qui ont une action avec des IC50 de 1 à plusieurs micromolaires). Le complexe YAP-TEAD régule l'expression des gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose, la croissance et motilité cellulaire, conduisant à une transformation oncogénique (Felley-Bosco et Stahel, 2014). Zhang *et al.*, montrent que la vertéporfine réduit significativement l'expression de YAP dans les cellules mésothéliales par une régulation négative de la transcription de son gène et l'orientation de la protéine YAP vers le protéasome (Zhang *et al.*, 2017). Malheureusement la vertéporfine a de nombreux effets indésirables qui empêchent son utilisation en clinique.

- En inhibant les signaux et voies autres que la voie Hippo mais participant eux aussi au contrôle de l'activité de YAP tels que les GPCRs, la signalisation RhoA ou B/Rho kinase (ROCK), les enzymes clés de la voie du mévalonate (statines, bisphosphonates et N-BPs). L'inhibiteur de Rho/ROCK (GSK269962A) prévient l'activation de YAP et inhibe l'activité transcriptionnelle de YAP-TEAD (Zhang *et al.*, 2017).

Les résultats que nous avons obtenus au cours de ce travail de thèse ainsi que ceux obtenus plus largement par notre groupe de recherche posent toutefois la question de la pertinence d'inhiber l'activité de YAP comme stratégie thérapeutique chez les patients atteints de MPM et présentant une altération de la voie RASSF/Hippo. En effet, nous montrons que, l'inactivation de l'expression de YAP dans des cellules des lignées mésothéliales (H28 et H2052) ou bronchiques (HBEC-3) n'exprimant plus RASSF1A, ne parvient pas à empêcher tous les désordres cellulaires provoqués par la perturbation de la voie de signalisation RASSF1/Hippo, et que ces cellules conservent leur capacité à croître sans adhésion (agar) (Dubois *et al.*, 2016, Maille *et al.*, article en préparation).

Le fait que l'inactivation de YAP ne soit pas suffisante pour empêcher tous les désordres induits par la perturbation de la voie RASSF/Hippo, pourrait s'expliquer par le fait qu'il n'existe pas un YAP mais plusieurs isoformes de YAP, et que les siARN utilisés dans nos travaux et les travaux de la littérature n'inactivent pas l'expression de l'ensemble de ces variants. Même si très peu de données existent sur les spécificités des différents variants de YAP, les outils actuellement disponibles pour les étudier étant peu nombreux, il est cependant établi que ces isoformes n'ont pas strictement la même fonction. YAP1-1 ne se liant pas au facteur p73, ne peut par exemple induire l'apoptose lorsque les cellules HEK293 sont privées de nutriments (Oka *et al.*, 2008). Autre exemple, l'angiomotine inhibe la fonction pro-apoptotique de YAP1-2 car prévient sa localisation nucléaire en interagissant avec YAP1-2 tandis que l'angiomotine ne peut se lier à YAP1-1 (Oka *et al.*, 2012). Enfin, dans le mélanome, YAP2 favoriserait l'invasion des cellules tumorales et non YAP1 (Nallet-Staub *et al.*, 2014).

Si l'inactivation de YAP n'empêche pas *in vitro* tous les désordres induits par la perturbation de la voie RASSF/Hippo et s'explique par le fait que les siARN utilisés dans nos travaux n'inactivent pas l'expression de l'ensemble de ces variants, alors il faudrait s'assurer que les inhibiteurs de l'activité de YAP actuellement en cours de développement inhibent eux l'ensemble de ces isoformes. Il pourrait en effet y avoir un phénomène de compensation entre

ces isoformes quand seul l'un des YAP est ciblé par les thérapies anti-YAP/TEAD. Il faut rappeler que YAP ne participe pas au contrôle de l'expression de gène en s'associant uniquement avec TEAD, et les interactions de YAP avec d'autres co-facteurs de transcription (RUNX2,...) pourraient elles-aussi rendre compte de l'activité oncogénique de YAP.

Enfin, que l'inactivation de YAP ne soit pas suffisante pour empêcher tous les désordres induits par la perturbation de la voie RASSF/Hippo dans les cellules de lignée bronchiques ou mésothéliales pourrait également s'expliquer par le fait que YAP peut jouer des rôles contradictoires dans la carcinogénèse. En effet si YAP est le plus souvent décrit comme étant un oncogène, il peut parfois également être décrit comme ayant des propriétés de gène suppresseur de tumeur (Bertini *et al.*, 2009; Perra *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014).

De nombreuses biothérapies ou thérapies ciblées sont utilisées en complément des thérapies conventionnelles, ou même en deuxième/troisième ligne thérapeutique pour les patients dont les tumeurs ne répondaient pas aux protocoles habituels. Actuellement, seul YAP est décrit comme modulant l'efficacité des inhibiteurs ou anticorps thérapeutiques, à l'inverse des chimiothérapies conventionnelles où YAP comme TAZ semblent intervenir (Hsu *et al.*, 2016; Zanconato *et al.*, 2016).

En effet, YAP augmenterait la chimio-sensibilité des cellules de carcinome hépatocellulaire en modulant p53, les domaines TEAD et WW étant nécessaires pour la fonction de p53 médiée par YAP. De plus, p53 pourrait avoir une rétroaction positive pour contrôler l'expression de YAP via l'interaction avec son promoteur (Bai *et al.*, 2013).

- **Bloquer l'action de l'AREG :**

Parmi les gènes dont la transcription est sous la dépendance de YAP et qui influe le comportement des cellules mésothéliales tumorales n'exprimant plus MST1 ou RASSF1A figure donc le gène codant l'Amphiréguline (AREG). Le niveau d'expression d'AREG reflète en effet la capacité d'invasion des cellules mésothéliales ce qui en accord avec les données montrant que la capacité d'invasion est fortement diminuée après la réduction de l'expression de l'AREG dans des cellules de carcinome mammaire (Baillo *et al.*, 2011) et cancéreuses ovarienne (So *et al.*, 2014).

Conclusions et Perspectives

Au terme de ce travail, nous avons atteint la plupart de nos objectifs, puisque nous souhaitons en effet :

1) Identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques du MPM en caractérisant les anomalies moléculaires de la voie de signalisation RASSF/Hippo chez les 448 patients inclus dans l'essai clinique MAPS en testant l'influence de ces anomalies sur la survie globale et/ou la survie sans progression de ces patients. Nous avons démontré que l'inactivation de l'expression de la kinase MST1 était un facteur de mauvais pronostic, alors qu'au contraire l'expression cytoplasmique de l'amphiréguline était un facteur de bon pronostic. Et enfin, en accord avec les données établit dans la littérature nous avons confirmé que l'expression du CD44 pouvait être un outil diagnostique du MPM. Nous ne sommes pas parvenus à identifier un biomarqueur de la prédictivité de la réponse à la nouvelle stratégie thérapeutique chez les patients inclus dans cet essai, en l'occurrence le bevacizumab.

2) Comprendre quelles fonctions et signalisations essentielles à l'homéostasie cellulaire, auxquelles participe la voie de signalisation RASSF/Hippo, sont perturbées lors du processus de transformation des cellules mésothéliales. Nous avons démontré que les altérations de la voie RASSF/Hippo, même si elles ne présentaient pas le même degré de criticité, conduisaient à une activité inappropriée de l'effecteur terminal de la voie Hippo, YAP. Concernant les patients atteints de MPM et présentant une inactivation de MST1, nous avons ainsi démontré que le moins bon pronostic de ces patients s'explique par le fait que MST1, en contrôlant la localisation subcellulaire de YAP, contrôle l'invasion, la croissance sans adhésion, la prolifération et l'apoptose des cellules mésothéliales tumorales. Cette compréhension des désordres cellulaires consécutifs à l'inactivation de MST1 fait de YAP une cible thérapeutique privilégiée chez les patients atteints de MPM, et présentant une altération de la voie de signalisation RASSF/Hippo.

A l'issue de ce travail, de nombreuses perspectives s'ouvrent à nous :

➤ **Approfondir les conséquences de l'inactivation de MST1**

- ***in vivo***

Nous montrons pour la première fois dans le MPM, que l'expression de la kinase MST1 prédit une meilleure survie de patients, en prévenant l'accumulation de YAP nucléaire, empêchant ainsi la dérégulation de la voie Hippo et des processus cellulaires associés (Maille *et al.*, article en préparation).

Aucune étude n'ayant à ce jour testée les conséquences de l'inactivation de MST1 *in vivo*, il serait intéressant d'invalider stablement l'expression de MST1 au moyen de shARN ou de la technologie CRISPR/Cas9 dans des cellules de lignées mésothéliales humaines et d'évaluer la capacité de ces cellules à former des xénogreffes et/ou des métastases lorsqu'implantées chez des souris immunodéprimées (SCID).

- **in vitro**

- Dans les processus de migration cellulaire.

Nous pourrions davantage caractériser le type de migration (collective, individuelle, amiboïde) que contrôle la kinase MST1 en suivant en temps réel, le déplacement de cellules mésothéliales humaines tumorales exprimant ou non cette kinase soit en 2D soit en 3D (cellules suspendues dans des gouttelettes de collagène de type I) mais aussi déterminer si l'expression de la kinase MST1 influence i) les migrations de type extravasation ou intravasation en réalisant des tests de migration trans-endothéliale et ii) le comportement des cellules lorsque placées dans un flux (afin de mimer le transport par la voie sanguine).

- Dans le déroulement du cycle cellulaire.

Nous pourrions également déterminer le rôle précis que joue MST1 sur le bon déroulement du cycle cellulaire. En plus de son rôle dans la voie Hippo, MST1 participe en effet au bon déroulement de la mitose en contrôlant notamment la duplication des centrosomes (Hergovich *et al.*, 2009) et la ségrégation précise des chromosomes (Oh *et al.*, 2010). Les substrats mitotiques de MST1/MST2 autres que Mob1 et LATS et le mécanisme d'activation de MST1/MST2 pendant la progression du cycle cellulaire ne sont pas connus et constituent peut-être les aspects les moins étudiés de leur régulation dans les cellules de mammifères (Hergovich et Hemmings, 2012).

Nous pourrions examiner les effets de la déplétion de MST1 sur des événements liés au cycle cellulaire (cytométrie en flux et IF et/ou WB des différents acteurs du cycle cellulaire). Il serait également intéressant de suivre la progression mitotique par microscopie time-lapse (dans les cellules avec siMST1 et un vecteur couplé avec GFP-H2B) ou encore la liaison des microtubules aux kinétochores dont la détérioration conduit à un mauvais alignement des chromosomes (cellules transfectées avec le vecteur GFP-H2B et le siMST1 puis marquées avec du sérum CREST (marque

les kinétochores) et l' α -tubuline. Ces expériences pourraient être réalisées en parallèle en présence ou non du siYAP et/ou TAZ car ils sont tous deux impliqués dans le cycle cellulaire.

La modification post-traductionnelle de YAP pendant la mitose et le mécanisme qui contrôle la phosphorylation de YAP à différents endroits, constituent aussi un point d'intérêt. YAP et TAZ sont phosphorylés sur plusieurs sites par CDK1 pendant la phase G2/M (Bui *et al.*, 2016; Dent *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2013, 2015b, 2015c; Zhao et Yang, 2015; Zhao *et al.*, 2014). Cependant, ces événements de phosphorylation sont plutôt complexes et controversés, certaines études montrent que la phosphorylation de YAP induite par CDK1 pendant la phase G2-M s'est révélée favoriser la transformation néoplasique en augmentant la migration cellulaire et l'invasion (Yang *et al.*, 2013, 2015b), alors que cette phosphorylation pendant le traitement anti-tubuline a été montré pour induire la mort des cellules cancéreuses (Zhao *et al.*, 2014). En plus de ses rôles dans la transcription, YAP est donc un régulateur direct de la mitose avec un rôle dans la cytokinèse (Bui *et al.*, 2016).

- Dans le contrôle des processus de mort cellulaire programmée.

Il serait intéressant d'étudier les différents acteurs de l'apoptose et de l'autophagie auquel participe la kinase MST1 dans le MPM afin de mieux comprendre son rôle dans ses différents processus et ce en présence ou absence de drogues de chimiothérapie (pemetrexed/cisplatine et/ou bevacizumab). Ce qui permettra d'apprécier la réponse des cellules mesothéliales à l'exposition des ces molécules de chimiothérapie utilisées dans l'essai MAPS. Par exemple évaluer l'activité/clivage des caspases, le clivage de Bax, la phosphorylation de Bcl-xl, l'expression et l'état de phosphorylation de H2B et des facteurs de transcription FOXO (tous deux sont des substrats de MST1) ou encore l'expression des inhibiteurs de l'apoptose et/ou des protéines pro-apoptotiques.

En ce qui concerne l'autophagie, nous pourrions cibler LC3 et Beclin1 tous deux régulés par MST1 (Maejima *et al.*, 2013; Wilkinson *et al.*, 2015) mais aussi Atg5, car ces trois protéines reflètent la formation des pré-autophagosomes. Comprendre les signaux qui régulent l'activation de tous ces programmes de mort cellulaire par MST1 et/ou l'influence de celle-ci sur la réponse aux drogues de chimiothérapie pourrait avoir un impact majeur sur le traitement du MPM, mais également de différentes pathologies.

➤ **Tester si YAP peut être une cible thérapeutique potentielle chez les patients atteints de MPM**

Nous montrons que l'augmentation de YAP nucléaire en absence de MST1 pourrait expliquer la moins bonne survie des patients atteints de MPM avec un phénotype plus « agressif » des cellules mésothéliales (Maille *et al.*, article en préparation) et ce en accord avec les données de la littérature (Wang *et al.*, 2016b; Woodard *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017). Il convient de continuer de disséquer le rôle de YAP dans les processus oncogénique, il sera donc intéressant dans plusieurs lignées mésothéliales de tester l'exposition aux inhibiteurs de YAP en présence ou absence de MST1 et/ou YAP, tels que la verteporfine (Wang *et al.*, 2016b) ou le VGLL4 connue pour empêcher l'interaction YAP-TEAD et regarder l'impact de ses drogues notamment au niveau de l'invasion cellulaire.

En plus des 4 lignées mésothéliales que nous avons déjà à notre disposition, il est indispensable d'en acquérir de nouvelles pour constituer un panel conséquent de modèles cellulaires et ainsi avoir une puissance de résultats suffisante pour étudier les conséquences de la perte d'expression de YAP en présence ou non de MST1.

En plus du type histologique, les récentes données expérimentales sur la base d'analyses de mutations sur des gènes suppresseurs de tumeurs, de profil d'expression des gènes, d'activation de voies de signal et de régulation épigénétique, révèlent une plus grande variabilité du MPM (Bonelli *et al.*, 2017b; Bueno *et al.*, 2016; De Reyniès *et al.*, 2014; De Rienzo *et al.*, 2016; Hysi *et al.*, 2014; Jean *et al.*, 2012; Miyanaga *et al.*, 2015; Tranchant *et al.*, 2017). Les échecs thérapeutiques et la variabilité de survie des patients pourraient s'expliquer par cette diversité. Dans ce contexte, il est alors nécessaire de disposer d'une connaissance précise des caractéristiques moléculaires individuelles des MPM.

Ainsi, l'ensemble de ces données justifie de définir une nouvelle classification de la diversité biologique du MPM, notamment au niveau moléculaire qui s'ajouterait à la classification histologique. De nouveaux espoirs de traitements, apparaissent, du fait de l'émergence de nouvelles thérapies ciblées, mieux adaptées aux caractéristiques spécifiques de chaque tumeur.

➤ **Comprendre l'apparente contradiction entre l'influence de l'expression de l'amphiréguline sur la survie de patients atteints de MPM et les données *in vitro***

L'AREG joue très certainement un rôle dans la carcinogenèse pleurale, mais il nous faudra d'abord tester les différentes hypothèses concernant sa maturation et/ou son état d'activité énumérées dans la partie III.B de ce manuscrit ([section résultats](#)), pour tenter d'expliquer cette contradiction entre les données cliniques et cellulaires. Le travail réalisé sur l'AREG au cours de cette thèse est le moins aboutit, mais permettra par la suite d'approfondir les résultats déjà obtenus sur cette partie pour aboutir *in fine* à un article.

En effet, nos premières données *in cell*, confirme le rôle probable de l'AREG dans la carcinogenèse pleurale et permettent ainsi de nous poser certaines questions sur leur contradiction avec les données cliniques auxquelles nous tâcherons de répondre par la suite. Nous ne pouvons pour l'instant que formuler des hypothèses pour expliquer pourquoi l'expression d'AREG cytosolique des cellules tumorales mésothéliales est un facteur de bon pronostic chez les patients atteints de MPM alors que l'AREG est en faveur de la migration cellulaire et de la prolifération.

Ces hypothèses sont autant de perspectives pour la suite de ce travail, il serait par exemple, intéressant de vérifier nos théories et tester l'hypothèse d'un défaut de clivage de l'AREG dans les cellules mésothéliales tumorales en quantifiant par zymographie l'activité des TACE. En déterminant si les cellules des lignées mésothéliales à notre disposition sont porteuses de la mutation Cys600, mutation inactivatrice de TACE (les prélèvements tumoraux des patients inclus dans l'essai MAPS étant trop entamés pour permettre une nouvelle extraction d'ADN), ou encore en quantifiant l'expression de la métalloprotéase NRDC et de ses pro-protéines convertases (PC).

Bibliographie

- Abdollahpour, H., Appaswamy, G., Kotlarz, D., Diestelhorst, J., Beier, R., Schäffer, A.A., Gertz, E.M., Schambach, A., Kreipe, H.H., Pfeifer, D., et al. (2012). The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood* *119*, 3450–3457.
- Adam, R.M., Chamberlin, S.G., and Davies, D.E. (1996). Induction of anchorage-independent growth by amphiregulin. *Growth Factors Chur Switz.* *13*, 193–203.
- Agathangelou, A., Cooper, W.N., and Latif, F. (2005). Role of the Ras-Association Domain Family 1 Tumor Suppressor Gene in Human Cancers. *Cancer Res.* *65*, 3497–3508.
- Al-Kaabi, A., van Bockel, L.W., Pothen, A.J., and Willems, S.M. (2014). p16INK4A and p14ARF gene promoter hypermethylation as prognostic biomarker in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Dis. Markers* *2014*, 260549.
- Andersen, M., Grauslund, M., Ravn, J., Sørensen, J.B., Andersen, C.B., and Santoni-Rugiu, E. (2014). Diagnostic Potential of miR-126, miR-143, miR-145, and miR-652 in Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Mol. Diagn.* *16*, 418–430.
- Andujar, P., Lacourt, A., Brochard, P., Pairon, J.-C., Jaurand, M.-C., and Jean, D. (2016). Five years update on relationships between malignant pleural mesothelioma and exposure to asbestos and other elongated mineral particles. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* *19*, 151–172.
- Aoe, K., Hiraki, A., Tanaka, T., Gemba, K.-I., Taguchi, K., Murakami, T., Sueoka, N., Kamei, T., Ueoka, H., Sugi, K., et al. (2006). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Malignant Mesothelioma. *Anticancer Res.* *26*, 4833–4836.
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell* *154*, 1047–1059.
- Arnette, C., Efimova, N., Zhu, X., Clark, G.J., and Kaverina, I. (2014). Microtubule segment stabilization by RASSF1A is required for proper microtubule dynamics and Golgi integrity. *Mol. Biol. Cell* *25*, 800–810.
- Ascoli, V., Cavone, D., Merler, E., Barbieri, P.G., Romeo, L., Nardi, F., and Musti, M. (2007). Mesothelioma in blood related subjects: Report of 11 clusters among 1954 Italy cases and review of the literature. *Am. J. Ind. Med.* *50*, 357–369.
- Asplund, T., and Heldin, P. (1994). Hyaluronan Receptors Are Expressed on Human Malignant Mesothelioma Cells but not on Normal Mesothelial Cells. *Cancer Res.* *54*, 4516–4523.
- de Assis, L.V.M., Locatelli, J., and Isoldi, M.C. (2014). The role of key genes and pathways involved in the tumorigenesis of Malignant Mesothelioma. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1845*, 232–247.
- Avruch, J., Praskova, M., Ortiz-Vega, S., Liu, M., and Zhang, X.-F. (2006). Nore1 and RASSF1 regulation of cell proliferation and of the MST1/2 kinases. *Methods Enzymol.* *407*, 290–310.
- Avruch, J., Zhou, D., Fitamant, J., Bardeesy, N., Mou, F., and Barrufet, L.R. (2012). Protein Kinases of the Hippo Pathway: Regulation and Substrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 770–784.
- Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., et al. (2014). YAP/TAZ Incorporation in the β -Catenin Destruction Complex Orchestrates the Wnt Response. *Cell* *158*, 157–170.
- Bai, N., Zhang, C., Liang, N., Zhang, Z., Chang, A., Yin, J., Li, Z., Li, N., Tan, X., Luo, N., et al. (2013). Yes-associated protein (YAP) increases chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells by modulation of p53. *Cancer Biol. Ther.* *14*, 511–520.
- Bai, Y., Liu, Y.-., Wang, H., Xu, Y., Stamenkovic, I., and Yu, Q. (2007). Inhibition of the hyaluronan-CD44 interaction by merlin contributes to the tumor-suppressor activity of merlin. *Oncogene* *26*, 836.
- Baillo, A., Giroux, C., and Ethier, S.P. (2011). Knock-down of amphiregulin inhibits cellular invasion in inflammatory breast cancer., Knock-down of Amphiregulin Inhibits Cellular Invasion in Inflammatory Breast Cancer. *J. Cell. Physiol. J. Cell. Physiol.* *226*, 226, 2691–2701.

- Baris, Y.I., and Grandjean, P. (2006). Prospective Study of Mesothelioma Mortality in Turkish Villages With Exposure to Fibrous Zeolite. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 98, 414–417.
- Baris, I., Simonato, L., Artvinli, M., Pooley, F., Saracci, R., Skidmore, J., and Wagner, C. (1987). Epidemiological and environmental evidence of the health effects of exposure to erionite fibres: a four-year study in the Cappadocian region of Turkey. *Int. J. Cancer* 39, 10–17.
- Basu, D., Lettan, R., Damodaran, K., Strellec, S., Reyes-Mugica, M., and Rebbaa, A. (2014). Identification, Mechanism of Action, and Antitumor Activity of a Small Molecule Inhibitor of Hippo, TGF- β , and Wnt Signaling Pathways. *Mol. Cancer Ther.* 13, 1457–1467.
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., and Downward, J. (2003). Akt Phosphorylates the Yes-Associated Protein, YAP, to Induce Interaction with 14-3-3 and Attenuation of p73-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* 11, 11–23.
- Batra, S., Shi, Y., Kuchenbecker, K.M., He, B., Reguart, N., Mikami, I., You, L., Xu, Z., Lin, Y.-C., Clément, G., et al. (2006). Wnt inhibitory factor-1, a Wnt antagonist, is silenced by promoter hypermethylation in malignant pleural mesothelioma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 1228–1232.
- Benedetti, S., Nuvoli, B., Catalani, S., and Galati, R. (2015). Reactive oxygen species a double-edged sword for mesothelioma. *Oncotarget* 6, 16848.
- Bennett, K.L., Jackson, D.G., Simon, J.C., Tanczos, E., Peach, R., Modrell, B., Stamenkovic, I., Plowman, G., and Aruffo, A. (1995). CD44 isoforms containing exon V3 are responsible for the presentation of heparin-binding growth factor. *J. Cell Biol.* 128, 687–698.
- Berasain, C., and Avila, M.A. (2014). Amphiregulin. *Semin. Cell Dev. Biol.* 28, 31–41.
- Bertini, E., Oka, T., Sudol, M., Strano, S., and Blandino, G. (2009). YAP: At the crossroad between transformation and tumor suppression. *Cell Cycle* 8, 49–57.
- Betti, M., Casalone, E., Ferrante, D., Romanelli, A., Grosso, F., Guarrera, S., Righi, L., Vatrano, S., Pelosi, G., Libener, R., et al. (2015). Inference on germline BAP1 mutations and asbestos exposure from the analysis of familial and sporadic mesothelioma in a high-risk area. *Genes. Chromosomes Cancer* 54, 51–62.
- Bhat, K.P.L., Salazar, K.L., Balasubramaniyan, V., Wani, K., Heathcock, L., Hollingsworth, F., James, J.D., Gumin, J., Diefes, K.L., Kim, S.H., et al. (2011). The transcriptional coactivator TAZ regulates mesenchymal differentiation in malignant glioma. *Genes Dev.* 25, 2594–2609.
- Bianchi, A.B., Mitsunaga, S.-I., Cheng, J.Q., Klein, W.M., Jhanwar, S.C., Seizinger, B., Kley, N., Klein-Szanto, A.J., and Testa, J.R. (1995). High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 10854–10858.
- Bitra, A., Sistla, S., Mariam, J., Malvi, H., and Anand, R. (2017). Rassf Proteins as Modulators of Mst1 Kinase Activity. *Sci. Rep.* 7, 45020.
- Blasco, M.A. (2002). Telomerase beyond telomeres. *Nat. Rev. Cancer* 2, 627–633.
- Boggiano, J.C., Vanderzalm, P.J., and Fehon, R.G. (2011). Tao-1 Phosphorylates Hippo/MST kinases to Regulate the Hippo-Salvador-Warts Tumor Suppressor Pathway. *Dev. Cell* 21, 888–895.
- Bois, M.C., Mansfield, A.S., Sukov, W.R., Jenkins, S.M., Moser, J.C., Sattler, C.A., Smith, C.Y., Molina, J.R., Peikert, T., and Roden, A.C. (2016). c-Met expression and MET amplification in malignant pleural mesothelioma. *Ann. Diagn. Pathol.* 23, 1–7.
- Bonelli, M.A., Fumarola, C., La Monica, S., and Alfieri, R. (2017a). New therapeutic strategies for malignant pleural mesothelioma. *Biochem. Pharmacol.* 123, 8–18.
- Bonelli, M.A., Digiacomio, G., Fumarola, C., Alfieri, R., Quaini, F., Falco, A., Madeddu, D., La Monica, S., Cretella, D., Ravelli, A., et al. (2017b). Combined Inhibition of CDK4/6 and PI3K/AKT/mTOR Pathways Induces a Synergistic Anti-Tumor Effect in Malignant Pleural Mesothelioma Cells. *Neoplasia N. Y.* 19, 637–648.
- Bott, M., Brevet, M., Taylor, B.S., Shimizu, S., Ito, T., Wang, L., Creaney, J., Lake, R.A., Zakowski, M.F., Reva, B., et al. (2011). The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat. Genet.* 43, 668–672.
- Bourguignon, L.Y.W. (2012). Hyaluronan-CD44 interaction promotes microRNA signaling and RhoGTPase activation leading to tumor progression. *Small GTPases* 3, 53–59.

- Bourguignon, L.Y.W., Peyrollier, K., Xia, W., and Gilad, E. (2008). Hyaluronan-CD44 Interaction Activates Stem Cell Marker Nanog, Stat-3-mediated MDR1 Gene Expression, and Ankyrin-regulated Multidrug Efflux in Breast and Ovarian Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 17635–17651.
- Bourguignon, L.Y.W., Shiina, M., and Li, J.-J. (2014). Chapter Ten - Hyaluronan-CD44 Interaction Promotes Oncogenic Signaling, microRNA Functions, Chemoresistance, and Radiation Resistance in Cancer Stem Cells Leading to Tumor Progression. In *Advances in Cancer Research*, M.A. Simpson, and P. Heldin, eds. (Academic Press), pp. 255–275.
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., and Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbial size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat. Immunol.* *15*, 1017–1025.
- Brevet, M., Shimizu, S., Bott, M.J., Shukla, N., Zhou, Q., Olshen, A.B., Rusch, V., and Ladanyi, M. (2011). Coactivation of receptor tyrosine kinases in malignant mesothelioma as a rationale for combination targeted therapy. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *6*, 864–874.
- Brosseau, S., Assoun, S., Naltet, C., Steinmetz, C., Gounant, V., and Zalcman, G. (2017). A review of bevacizumab in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Future Oncol.*
- Bueno, R., Stawiski, E.W., Goldstein, L.D., Durinck, S., De Rienzo, A., Modrusan, Z., Gnad, F., Nguyen, T.T., Jaiswal, B.S., Chirieac, L.R., et al. (2016). Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat. Genet.* *48*, 407–416.
- Bui, D.A., Lee, W., White, A.E., Harper, J.W., Schackmann, R.C.J., Overholtzer, M., Selfors, L.M., and Brugge, J.S. (2016). Cytokinesis involves a nontranscriptional function of the Hippo pathway effector YAP. *Sci. Signal.* *9*, ra23.
- Bunn, W.B., Bender, J.R., Hesterberg, T.W., Chase, G.R., and Konzen, J.L. (1993). Recent studies of man-made vitreous fibers. Chronic animal inhalation studies. *J. Occup. Med. Off. Publ. Ind. Med. Assoc.* *35*, 101–113.
- Busser, B., Sancey, L., Jossierand, V., Niang, C., Favrot, M.C., Coll, J.-L., and Hurbin, A. (2010). Amphiregulin Promotes BAX Inhibition and Resistance to Gefitinib in Non-small-cell Lung Cancers. *Mol. Ther.* *18*, 528–535.
- Busser, B., Sancey, L., Brambilla, E., Coll, J.-L., and Hurbin, A. (2011). The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1816*, 119–131.
- Cagle, P.T., and Allen, T.C. (2011). Pathology of the pleura: What the pulmonologists need to know: Pathology of the pleura. *Respirology* *16*, 430–438.
- Cai, W.-F., Wang, L., Liu, G.-S., Zhu, P., Paul, C., and Wang, Y. (2016). Manipulating the Hippo-Yap signal cascade in stem cells for heart regeneration. *Ann. Palliat. Med.* *5*, 125–134.
- Campbell, K., Brosseau, S., Reviron-Rabec, L., Bergot, E., Lechapt, E., Levallet, G., and Zalcman, G. (2013). Mésothéliomes malins pleuraux: le point en 2013. *Bull. Cancer (Paris)* *100*, 1283–1293.
- Carbone, M., and Yang, H. (2017). Mesothelioma: recent highlights. *Ann. Transl. Med.* *5*, 238–238.
- Carbone, M., Emri, S., Dogan, A.U., Steele, I., Tuncer, M., Pass, H.I., and Baris, Y.I. (2007). A mesothelioma epidemic in Cappadocia: scientific developments and unexpected social outcomes. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 147–154.
- Carbone, M., Baris, Y.I., Bertino, P., Brass, B., Comertpay, S., Dogan, A.U., Gaudino, G., Jube, S., Kanodia, S., Partridge, C.R., et al. (2011). Erionite exposure in North Dakota and Turkish villages with mesothelioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 13618–13623.
- Carbone, M., Ly, B.H., Dodson, R.F., Pagano, I., Morris, P.T., Dogan, U.A., Gazdar, A.F., Pass, H.I., and Yang, H. (2012). Malignant mesothelioma: Facts, Myths, and Hypotheses. *J. Cell. Physiol.* *227*, 44–58.
- Cassimeris, L. (1999). Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 134–141.
- Cesario, A., Catassi, A., Festi, L., Imperatori, A., Pericelli, A., Galetta, D., Margaritora, S., Porziella, V., Cardaci, V., Granone, P., et al. (2005). Farnesyltransferase Inhibitors and Human Malignant Pleural Mesothelioma: A First-Step Comparative Translational Study. *Clin. Cancer Res.* *11*, 2026–2037.
- Chan, E.H.Y., Nousiainen, M., Chalamalasetty, R.B., Schäfer, A., Nigg, E.A., and Silljé, H.H.W. (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* *24*, 2076–2086.
- Chan, S.W., Lim, C.J., Chong, Y.F., Pobbati, A.V., Huang, C., and Hong, W. (2011). Hippo Pathway-independent Restriction of TAZ and YAP by Angiomotin. *J. Biol. Chem.* *286*, 7018–7026.

- Chang, C.-J., Yin, P.-H., Yang, D.-M., Wang, C.-H., Hung, W.-Y., Chi, C.-W., Wei, Y.-H., and Lee, H.-C. (2009). Mitochondrial dysfunction-induced amphiregulin upregulation mediates chemo-resistance and cell migration in HepG2 cells. *Cell. Mol. Life Sci.* *66*, 1755–1765.
- Chang, M.H., Ahn, H.K., Lee, J., Jung, C.-K., Choi, Y.-L., Park, Y.H., Ahn, J.S., Park, K., and Ahn, M.-J. (2011). Clinical impact of amphiregulin expression in patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) wild-type nonsmall cell lung cancer treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* *117*, 143–151.
- Chayangsu, C., and Sriuranpong, V. (2016). Serum amphiregulin in colorectal carcinoma and the correlation with liver metastasis. *J. Clin. Oncol.* *34*, e15078–e15078.
- Chen, Y., Fu, Z., Xu, S., Xu, Y., and Xu, P. (2014). The prognostic value of CD44 expression in gastric cancer: A meta-Analysis. *Biomed. Pharmacother.* *68*, 693–697.
- Chernova, T., Murphy, F.A., Galavotti, S., Sun, X.-M., Powley, I.R., Grosso, S., Schinwald, A., Zacarias-Cabeza, J., Dudek, K.M., Dinsdale, D., et al. (2017). Long-Fiber Carbon Nanotubes Replicate Asbestos-Induced Mesothelioma with Disruption of the Tumor Suppressor Gene Cdkn2a (Ink4a/Arf). *Curr. Biol.* *27*, 3302–3314.e6.
- Chiba, S., Ikeda, M., Katsunuma, K., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2009). MST2- and Furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes. *Curr. Biol. CB* *19*, 675–681.
- Chiba, S., Amagai, Y., Homma, Y., Fukuda, M., and Mizuno, K. (2013). NDR2-mediated Rabin8 phosphorylation is crucial for ciliogenesis by switching binding specificity from phosphatidylserine to Sec15. *EMBO J.* *32*, 874–885.
- Chirieac, L.R., Barletta, J.A., Yeap, B.Y., Richards, W.G., Tilleman, T., Bueno, R., Baldini, E.H., Godleski, J., and Sugarbaker, D.J. (2013). Clinicopathologic characteristics of malignant mesotheliomas arising in patients with a history of radiation for Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *31*, 4544–4549.
- Chung, E., Cook, P.W., Parkos, C.A., Park, Y.-K., Pittelkow, M.R., and Coffey, R.J. (2005). Amphiregulin causes functional downregulation of adherens junctions in psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* *124*, 1134–1140.
- Cinar, B., Fang, P.-K., Lutchman, M., Di Vizio, D., Adam, R.M., Pavlova, N., Rubin, M.A., Yelick, P.C., and Freeman, M.R. (2007). The pro-apoptotic kinase Mst1 and its caspase cleavage products are direct inhibitors of Akt1. *EMBO J.* *26*, 4523–4534.
- Cioce, M., Ganci, F., Canu, V., Sacconi, A., Mori, F., Canino, C., Korita, E., Casini, B., Alessandrini, G., Cambria, A., et al. (2014). Protumorigenic effects of mir-145 loss in Malignant Pleural Mesothelioma. *Oncogene* *33*, 5319–5331.
- Cleaver, A.L., Bhamidipaty, K., Wylie, B., Connor, T., Robinson, C., Robinson, B.W., Mutsaers, S.E., and Lake, R.A. (2014). Long-term exposure of mesothelial cells to SV40 and asbestos leads to malignant transformation and chemotherapy resistance. *Carcinogenesis* *35*, 407–414.
- Cornils, H., Kohler, R.S., Hergovich, A., and Hemmings, B.A. (2011). Downstream of human NDR kinases: impacting on c-myc and p21 protein stability to control cell cycle progression. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 1897–1904.
- Cortes-Dericks, L., and Schmid, R.A. (2017). CD44 and its ligand hyaluronan as potential biomarkers in malignant pleural mesothelioma: evidence and perspectives. *Respir. Res.* *18*.
- Couzens, A.L., Xiong, S., Knight, J.D.R., Mao, D.Y., Guettler, S., Picaud, S., Kurinov, I., Filippakopoulos, P., Sicheri, F., and Gingras, A.-C. (2017). MOB1 Mediated Phospho-recognition in the Core Mammalian Hippo Pathway. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *16*, 1098–1110.
- Cox, A.D., and Der, C.J. (2003). The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* *22*, 8999–9006.
- Creasy, C.L., and Chernoff, J. (1995). Cloning and characterization of a member of the MST subfamily of Ste20-like kinases. *Gene* *167*, 303–306.
- Creasy, C.L., Ambrose, D.M., and Chernoff, J. (1996). The Ste20-like Protein Kinase, Mst1, Dimerizes and Contains an Inhibitory Domain. *J. Biol. Chem.* *271*, 21049–21053.
- Cutrone, R., Lednicky, J., Dunn, G., Rizzo, P., Bocchetta, M., Chumakov, K., Minor, P., and Carbone, M. (2005). Some Oral Poliovirus Vaccines Were Contaminated with Infectious SV40 after 1961. *Cancer Res.* *65*, 10273–10279.

- Dallol, A., Agathangelou, A., Tommasi, S., Pfeifer, G.P., Maher, E.R., and Latif, F. (2005). Involvement of the RASSF1A Tumor Suppressor Gene in Controlling Cell Migration. *Cancer Res.* *65*, 7653–7659.
- Dallol, A., Cooper, W.N., Al-Mulla, F., Agathangelou, A., Maher, E.R., and Latif, F. (2007). Depletion of the Ras Association Domain Family 1, Isoform A–Associated Novel Microtubule-Associated Protein, C19ORF5/MAP1S, Causes Mitotic Abnormalities. *Cancer Res.* *67*, 492–500.
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J.-H., Chin, P.L., Bates, S., and Pfeifer, G.P. (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat. Genet.* *25*, 315–319.
- Dan, T., Hewitt, S.M., Ohri, N., Ly, D., Soule, B.P., Smith, S.L., Matsuda, K., Council, C., Shankavaram, U., Lippman, M.E., et al. (2014). CD44 is prognostic for overall survival in the NCI randomized trial on breast conservation with 25 year follow-up. *Breast Cancer Res. Treat.* *143*, 11–18.
- Das, A., Fischer, R.S., Pan, D., and Waterman, C.M. (2016). YAP Nuclear Localization in the Absence of Cell-Cell Contact Is Mediated by a Filamentous Actin-dependent, Myosin II- and Phospho-YAP-independent Pathway during Extracellular Matrix Mechanosensing. *J. Biol. Chem.* *291*, 6096–6110.
- De Reyniès, A., Jaurand, M.-C., Renier, A., Couchy, G., Hysi, I., Elarouci, N., Galateau-Sallé, F., Copin, M.-C., Hofman, P., Cazes, A., et al. (2014). Molecular Classification of Malignant Pleural Mesothelioma: Identification of a Poor Prognosis Subgroup Linked to the Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clin. Cancer Res.* *20*, 1323–1334.
- De Rienzo, A.D., Archer, M.A., Yeap, B.Y., Dao, N., Sciaranghella, D., Sideris, A.C., Zheng, Y., Holman, A.G., Wang, Y.E., Dal Cin, P.S., et al. (2016). Gender-Specific Molecular and Clinical Features underlie Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Res.* *76*, 319–328.
- Deel, M.D., Li, J.J., Crose, L.E.S., and Linardic, C.M. (2015). A Review: Molecular Aberrations within Hippo Signaling in Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Front. Oncol.* *5*.
- Del Re, D.P., Matsuda, T., Zhai, P., Maejima, Y., Jain, M.R., Liu, T., Li, H., Hsu, C.-P., and Sadoshima, J. (2014). Mst1 promotes cardiac myocyte apoptosis through phosphorylation and inhibition of Bcl-xL. *Mol. Cell* *54*, 639–650.
- Dent, L.G., Poon, C.L.C., Zhang, X., Degoutin, J.L., Tipping, M., Veraksa, A., and Harvey, K.F. (2015). The GTPase regulatory proteins Pix and Git control tissue growth via the Hippo pathway. *Curr. Biol. CB* *25*, 124–130.
- DeRan, M., Yang, J., Shen, C.-H., Peters, E.C., Fitamant, J., Chan, P., Hsieh, M., Zhu, S., Asara, J.M., Zheng, B., et al. (2014). Energy stress regulates hippo-YAP signaling involving AMPK-mediated regulation of angiomin-like 1 protein. *Cell Rep.* *9*, 495–503.
- Destro, A., Ceresoli, G.L., Falleni, M., Zucali, P.A., Morengi, E., Bianchi, P., Pellegrini, C., Cordani, N., Vaira, V., Alloisio, M., et al. (2006). EGFR overexpression in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer* *51*, 207–215.
- Destro, A., Ceresoli, G.L., Baryshnikova, E., Garassino, I., Zucali, P.A., De Vincenzo, F., Bianchi, P., Morengi, E., Testori, A., Alloisio, M., et al. (2008). Gene methylation in pleural mesothelioma: correlations with clinicopathological features and patient's follow-up. *Lung Cancer Amst. Neth.* *59*, 369–376.
- Di Agostino, S., Sorrentino, G., Ingallina, E., Valenti, F., Ferraiuolo, M., Bicciato, S., Piazza, S., Strano, S., Del Sal, G., and Blandino, G. (2016). YAP enhances the pro-proliferative transcriptional activity of mutant p53 proteins. *EMBO Rep.* *17*, 188–201.
- Dianzani, I., Gibello, L., Biava, A., Giordano, M., Bertolotti, M., Betti, M., Ferrante, D., Guarrera, S., Betta, G.P., Mirabelli, D., et al. (2006). Polymorphisms in DNA repair genes as risk factors for asbestos-related malignant mesothelioma in a general population study. *Mutat. Res.* *599*, 124–134.
- Donninger, H., Vos, M.D., and Clark, G.J. (2007). The RASSF1A tumor suppressor. *J. Cell Sci.* *120*, 3163–3172.
- Dubois, F., Keller, M., Calvayrac, O., Soncin, F., Hoa, L., Hergovich, A., Parrini, M.-C., Mazieres, J., Vaisse-Lesteven, M., Camonis, J., et al. (2016). RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. *Cancer Res.* *76*, 1627–1640.
- Duffy, M.J., McKiernan, E., O'Donovan, N., and McGowan, P.M. (2009). Role of ADAMs in Cancer Formation and Progression. *Clin. Cancer Res.* *15*, 1140–1144.

- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* *474*, 179–183.
- Dutta, S., Mana-Capelli, S., Paramasivam, M., Dasgupta, I., Cirka, H., Billiar, K., and McCollum, D. (2018). TRIP6 inhibits Hippo signaling in response to tension at adherens junctions. *EMBO Rep.* *19*, 337–350.
- Eckstein, N., Servan, K., Girard, L., Cai, D., von Jonquieres, G., Jaehde, U., Kassack, M.U., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Royer, H.-D. (2008). Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Analysis Identifies Amphiregulin as a Key Factor for Cisplatin Resistance of Human Breast Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 739–750.
- Edwards, J., Abrams, K., Leverment, J., Spyt, T., Waller, D., and O’Byrne, K. (2000). Prognostic factors for malignant mesothelioma in 142 patients: validation of CALGB and EORTC prognostic scoring systems. *Thorax* *55*, 731–735.
- Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A.E.M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalska, A.J., Oria, R., Kechagia, J.Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A.-L., et al. (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* *171*, 1397–1410.e14.
- Emoto, K., Parrish, J.Z., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2006). The tumour suppressor Hippo acts with the NDR kinases in dendritic tiling and maintenance. *Nature* *443*, 210–213.
- Enewold, L., Sharon, E., and Thomas, A. (2017). Patterns of care and survival among patients with malignant mesothelioma in the United States. *Lung Cancer* *112*, 102–108.
- Engels, E.A., Katki, H.A., Nielsen, N.M., Winther, J.F., Hjalgrim, H., Gjerris, F., Rosenberg, P.S., and Frisch, M. (2003). Cancer Incidence in Denmark Following Exposure to Poliovirus Vaccine Contaminated With Simian Virus 40. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *95*, 532–539.
- Erren, T.C., Jacobsen, M., and Piekarski, C. (1999). Synergy between asbestos and smoking on lung cancer risks. *Epidemiol. Camb. Mass* *10*, 405–411.
- Esteban, F., Bravo, J.J., González-Moles, M.A., Bravo, M., Ruiz-Avila, I., and Gil-Montoya, J.A. (2005). Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in laryngeal cancer. *Anticancer Res.* *25*, 1115–1121.
- Farioli, A., Violante, F.S., Mattioli, S., Curti, S., and Kriebel, D. (2013). Risk of mesothelioma following external beam radiotherapy for prostate cancer: a cohort analysis of SEER database. *Cancer Causes Control* *24*, 1535–1545.
- Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., and Elazar, Z. (2006). Microtubules Support Production of Starvation-induced Autophagosomes but Not Their Targeting and Fusion with Lysosomes. *J. Biol. Chem.* *281*, 36303–36316.
- Fausti, F., Di Agostino, S., Sacconi, A., Strano, S., and Blandino, G. (2012). Hippo and rassf1a Pathways: A Growing Affair.
- Felley-Bosco, E., and Stahel, R. (2014). Hippo/YAP pathway for targeted therapy. *Transl. Lung Cancer Res.* *3*, 75.
- Fenton, S.L., Dallol, A., Agathangelou, A., Hesson, L., Ahmed-Choudhury, J., Baksh, S., Sardet, C., Dammann, R., Minna, J.D., Downward, J., et al. (2004). Identification of the E1A-Regulated Transcription Factor p120E4F as an Interacting Partner of the RASSF1A Candidate Tumor Suppressor Gene. *Cancer Res.* *64*, 102–107.
- Finch-Edmondson, M.L., Strauss, R.P., Clayton, J.S., Yeoh, G.C., and Callus, B.A. (2016). Splice variant insertions in the C-terminus impairs YAP’s transactivation domain. *Biochem. Biophys. Rep.* *6*, 24–31.
- Fischer, J.R., Ohnmacht, U., Rieger, N., Zemaitis, M., Stoffregen, C., Kostrzewa, M., Buchholz, E., Manegold, C., and Lahm, H. (2006). Promoter methylation of RASSF1A, RARbeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer Amst. Neth.* *54*, 109–116.
- Fischer, M., Rikeit, P., Knaus, P., and Coirault, C. (2016). YAP-Mediated Mechanotransduction in Skeletal Muscle. *Front. Physiol.* *7*.
- Fontanini, G., De Laurentiis, M., Vignati, S., Chinè, S., Lucchi, M., Silvestri, V., Mussi, A., De Placido, S., Tortora, G., Bianco, A.R., et al. (1998). Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *4*, 241–249.

- Fox, S.A., Richards, A.K., Kusumah, I., Perumal, V., Bolitho, E.M., Mutsaers, S.E., and Dharmarajan, A.M. (2013). Expression profile and function of Wnt signaling mechanisms in malignant mesothelioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *440*, 82–87.
- Frebourg, T., Lerebours, G., Delpech, B., Benhamou, D., Bertrand, P., Maingonnat, C., Boutin, C., and Nouvet, G. (1987). Serum hyaluronate in malignant pleural mesothelioma. *Cancer* *59*, 2104–2107.
- Fujii, M., Fujimoto, N., Hiraki, A., Gemba, K., Aoe, K., Umemura, S., Katayama, H., Takigawa, N., Kiura, K., Tanimoto, M., et al. (2012). Aberrant DNA methylation profile in pleural fluid for differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Sci.* *103*, 510–514.
- Fujimoto, N., Gemba, K., Asano, M., Fuchimoto, Y., Wada, S., Ono, K., Ozaki, S., and Kishimoto, T. (2013). Hyaluronic acid in the pleural fluid of patients with malignant pleural mesothelioma. *Respir. Investig.* *51*, 92–97.
- Fukuda, S., Nishida-Fukuda, H., Nakayama, H., Inoue, H., and Higashiyama, S. (2012). Monoubiquitination of pro-amphiregulin regulates its endocytosis and ectodomain shedding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *420*, 315–320.
- Furth, N., and Aylon, Y. (2017). The LATS1 and LATS2 tumor suppressors: beyond the Hippo pathway. *Cell Death Differ.* *24*, 1488.
- Gaffney, C.J., Oka, T., Mazack, V., Hilman, D., Gat, U., Muramatsu, T., Inazawa, J., Golden, A., Carey, D.J., Farooq, A., et al. (2012). Identification, basic characterization and evolutionary analysis of differentially spliced mRNA isoforms of human YAP1 gene. *Gene* *509*, 215–222.
- Galan, J.A., and Avruch, J. (2016). MST1/MST2 Protein Kinases: Regulation and Physiologic Roles. *Biochemistry (Mosc.)* *55*, 5507–5519.
- Gandhirajan, R.K., Jain, M., Walla, B., Johnsen, M., Bartram, M.P., Huynh Anh, M., Rinschen, M.M., Benzing, T., and Schermer, B. (2016). Cysteine S-Glutathionylation Promotes Stability and Activation of the Hippo Downstream Effector Transcriptional Co-activator with PDZ-binding Motif (TAZ). *J. Biol. Chem.* *291*, 11596–11607.
- Gao, J., Ulekleiv, C.H., and Halstensen, T.S. (2016). Epidermal growth factor (EGF) receptor-ligand based molecular staging predicts prognosis in head and neck squamous cell carcinoma partly due to deregulated EGF-induced amphiregulin expression. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* *CR 35*.
- Ge, R., Tan, E., Sharghi-Namini, S., and Asada, H.H. (2012). Exosomes in Cancer Microenvironment and Beyond: have we Overlooked these Extracellular Messengers? *Cancer Microenviron.* *5*, 323–332.
- Genevet, A., Wehr, M.C., Brain, R., Thompson, B.J., and Tapon, N. (2010). Kibra Is a Regulator of the Salvador/Warts/Hippo Signaling Network. *Dev. Cell* *18*, 300–308.
- Ghazaleh, H.A., Chow, R.S., Choo, S.L., Pham, D., Olesen, J.D., Wong, R.X., Onyskiw, C., and Baksh, S. (2010). 14-3-3 mediated regulation of the tumor suppressor protein, RASSF1A. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *15*, 117–127.
- Gilham, C., Rake, C., Burdett, G., Nicholson, A.G., Davison, L., Franchini, A., Carpenter, J., Hodgson, J., Darnton, A., and Peto, J. (2016). Original article: Pleural mesothelioma and lung cancer risks in relation to occupational history and asbestos lung burden. *Occup. Environ. Med.* *73*, 290.
- Gloerich, M., ten Klooster, J.P., Vliem, M.J., Koorman, T., Zwartkruis, F.J., Clevers, H., and Bos, J.L. (2012). Rap2A links intestinal cell polarity to brush border formation. *Nat. Cell Biol.* *14*, 793–801.
- Goldberg, S., and Rey, G. (2012). Modélisation de l'évolution de la mortalité par mésothéliome de la plèvre en France. *Proj. À Horiz.* *2050*.
- Gomez, M., Gomez, V., and Hergovich, A. (2014). The Hippo pathway in disease and therapy: cancer and beyond. *Clin. Transl. Med.* *3*, 22.
- Goodison, S., Urquidi, V., and Tarin, D. (1999). CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* *52*, 189–196.
- Goodman, J.E., Nascarella, M.A., and Valberg, P.A. (2009). Ionizing radiation: a risk factor for mesothelioma. *Cancer Causes Control CCC* *20*, 1237–1254.
- Graves, J.D., Gotoh, Y., Draves, K.E., Ambrose, D., Han, D.K., Wright, M., Chernoff, J., Clark, E.A., and Krebs, E.G. (1998). Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1. *EMBO J.* *17*, 2224–2234.

- Greim, H., Utell, M.J., Maxim, L.D., and Niebo, R. (2014). Perspectives on refractory ceramic fiber (RCF) carcinogenicity: comparisons with other fibers. *Inhal. Toxicol.* 26, 789–810.
- Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2003). TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. *EMBO J.* 22, 2411–2421.
- Gumbiner, B.M., and Kim, N.-G. (2014). The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth. *J. Cell Sci.* 127, 709–717.
- Gundogdu, R., and Hergovich, A. (2016). The Possible Crosstalk of MOB2 With NDR1/2 Kinases in Cell Cycle and DNA Damage Signaling. *J. Cell Signal.* 1.
- Guo, L., and Teng, L. (2015). YAP/TAZ for cancer therapy: Opportunities and challenges (Review). *Int. J. Oncol.* 46, 1444–1452.
- Guo, C., Tommasi, S., Liu, L., Yee, J.-K., Dammann, R., and Pfeifer, G.P. (2007). RASSF1A is part of a complex similar to the Drosophila Hippo/Salvador/Lats tumor-suppressor network. *Curr. Biol. CB* 17, 700–705.
- Guo, C., Zhang, X., and Pfeifer, G.P. (2011). The Tumor Suppressor RASSF1A Prevents Dephosphorylation of the Mammalian STE20-like Kinases MST1 and MST2. *J. Biol. Chem.* 286, 6253–6261.
- Guo, G., Chmielecki, J., Goparaju, C., Heguy, A., Dolgalev, I., Carbone, M., Seepo, S., Meyerson, M., and Pass, H.I. (2015). Whole-Exome Sequencing Reveals Frequent Genetic Alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Res.* 75, 264–269.
- Gupta, S., Govindaraghavan, M., and McCollum, D. (2014). Cross Talk between NDR Kinase Pathways Coordinates Cytokinesis with Cell Separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell* 13, 1104–1112.
- Habbig, S., Bartram, M.P., Müller, R.U., Schwarz, R., Andriopoulos, N., Chen, S., Sägmüller, J.G., Hoehne, M., Burst, V., Liebau, M.C., et al. (2011). NPHP4, a cilia-associated protein, negatively regulates the Hippo pathway. *J. Cell Biol.* 193, 633–642.
- Halpain, S., and Dehmelt, L. (2006). The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.* 7, 224.
- Hanagiri, T., Shinohara, S., Takenaka, M., Shigematsu, Y., Yasuda, M., Shimokawa, H., Nagata, Y., Nakagawa, M., Uramoto, H., So, T., et al. (2012). Effects of hyaluronic acid and CD44 interaction on the proliferation and invasiveness of malignant pleural mesothelioma. *Tumor Biol.* 33, 2135–2141.
- Hartmann, M., Parra, L.M., Ruschel, A., Böhme, S., Li, Y., Morrison, H., Herrlich, A., and Herrlich, P. (2015). Tumor Suppressor NF2 Blocks Cellular Migration by Inhibiting Ectodomain Cleavage of CD44. *Mol. Cancer Res.* 13, 879–890.
- Hata, S., Hirayama, J., Kajihio, H., Nakagawa, K., Hata, Y., Katada, T., Furutani-Seiki, M., and Nishina, H. (2012). A Novel Acetylation Cycle of Transcription Co-activator Yes-associated Protein That Is Downstream of Hippo Pathway Is Triggered in Response to S_N2 Alkylating Agents. *J. Biol. Chem.* 287, 22089–22098.
- Hebert, L., Bellanger, D., Guillas, C., Campagne, A., Dingli, F., Loew, D., Fievet, A., Jacquemin, V., Popova, T., and Jean, D. (2017). Modulating BAP1 expression affects ROS homeostasis, cell motility and mitochondrial function. *Oncotarget* 8, 72513.
- Hergovich, A. (2011). MOB control: Reviewing a conserved family of kinase regulators. *Cell. Signal.* 23, 1433–1440.
- Hergovich, A. (2012). Mammalian Hippo signalling: a kinase network regulated by protein–protein interactions: Figure 1. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 124–128.
- Hergovich, A. (2013). Regulation and functions of mammalian LATS/NDR kinases: looking beyond canonical Hippo signalling. *Cell Biosci.* 3, 32.
- Hergovich, A., and Hemmings, B.A. (2012). Hippo signalling in the G2/M cell cycle phase: lessons learned from the yeast MEN and SIN pathways. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 794–802.
- Hergovich, A., Kohler, R.S., Schmitz, D., Vichalkovski, A., Cornils, H., and Hemmings, B.A. (2009). The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation. *Curr. Biol. CB* 19, 1692–1702.
- Hesson, L., Bièche, I., Krex, D., Criniere, E., Hoang-Xuan, K., Maher, E.R., and Latif, F. (2004). Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* 23, 2408–2419.

- Hesson, L.B., Wilson, R., Morton, D., Adams, C., Walker, M., Maher, E.R., and Latif, F. (2005). CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations. *Oncogene* 24, 3987–3994.
- Higginbotham, J.N., Beckler, M.D., Gephart, J.D., Franklin, J.L., Bogatcheva, G., Kremers, G.-J., Piston, D.W., Ayers, G.D., McConnell, R.E., Tyska, M.J., et al. (2011). Amphiregulin exosomes increase cancer cell invasion. *Curr. Biol. CB* 21, 779–786.
- Hilman, D., and Gat, U. (2011). The evolutionary history of YAP and the hippo/YAP pathway. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2403–2417.
- Hirota, T., Morisaki, T., Nishiyama, Y., Marumoto, T., Tada, K., Hara, T., Masuko, N., Inagaki, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2000). Zyxin, a Regulator of Actin Filament Assembly, Targets the Mitotic Apparatus by Interacting with H-Warts/Lats1 Tumor Suppressor. *J. Cell Biol.* 149, 1073–1086.
- Hobor, S., Van Emburgh, B.O., Crowley, E., Misale, S., Di Nicolantonio, F., and Bardelli, A. (2014). TGF and Amphiregulin Paracrine Network Promotes Resistance to EGFR Blockade in Colorectal Cancer Cells. *Clin. Cancer Res.* 20, 6429–6438.
- Hodgson, D.C., Gilbert, E.S., Dores, G.M., Schonfeld, S.J., Lynch, C.F., Storm, H., Hall, P., Langmark, F., Pukkala, E., Andersson, M., et al. (2007). Long-term solid cancer risk among 5-year survivors of Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 1489–1497.
- Hodgson, J.T., McElvenny, D.M., Darnton, A.J., Price, M.J., and Peto, J. (2005). The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br. J. Cancer* 92, 587–593.
- Hong, W., and Guan, K.-L. (2012). The YAP and TAZ transcription coactivators: key downstream effectors of the mammalian Hippo pathway. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 785–793.
- Hong, X., Nguyen, H.T., Chen, Q., Zhang, R., Hagman, Z., Voorhoeve, P.M., and Cohen, S.M. (2014). Opposing activities of the Ras and Hippo pathways converge on regulation of YAP protein turnover. *EMBO J.* 33, 2447–2457.
- Hopkins-Donaldson, S., Belyanskaya, L.L., Simões-Wüst, A.P., Sigrist, B., Kurtz, S., Zangemeister-Wittke, U., and Stahel, R. (2006). p53-Induced Apoptosis Occurs in the Absence of p14ARF in Malignant Pleural Mesothelioma. *Neoplasia N. Y. N* 8, 551–559.
- Hsu, P.-C., You, B., Yang, Y.-L., Zhang, W.-Q., Wang, Y.-C., Xu, Z., Dai, Y., Liu, S., Yang, C.-T., Li, H., et al. (2016). YAP promotes erlotinib resistance in human non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget* 7, 51922–51933.
- Huang, S.X.L., Jaurand, M.-C., Kamp, D.W., Whysner, J., and Hei, T.K. (2011). Role of Mutagenicity in Asbestos Fiber-Induced Carcinogenicity and Other Diseases. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 14, 179–245.
- Huang, W., Lv, X., Liu, C., Zha, Z., Zhang, H., Jiang, Y., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., and Guan, K.-L. (2012). The N-terminal Phosphodegron Targets TAZ/WWTR1 Protein for SCF β -TrCP-dependent Degradation in Response to Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition. *J. Biol. Chem.* 287, 26245–26253.
- Huh, J.W., Kim, H.R., Kim, Y.J., Lee, J.H., Park, Y.S., Cho, S.H., and Joo, J.K. (2009). Expression of standard CD44 in human colorectal carcinoma: Association with prognosis. *Pathol. Int.* 59, 241–246.
- Huo, Y., Cai, H., Teplova, I., Bowman-Colin, C., Chen, G., Price, S., Barnard, N., Ganesan, S., Karantza, V., White, E., et al. (2013). Autophagy opposes p53-mediated tumor barrier to facilitate tumorigenesis in a model of PALB2-associated hereditary breast cancer. *Cancer Discov.* 3, 894–907.
- Hurbin, A., Dubrez, L., Coll, J.-L., and Favrot, M.-C. (2002). Inhibition of Apoptosis by Amphiregulin via an Insulin-like Growth Factor-1 Receptor-dependent Pathway in Non-small Cell Lung Cancer Cell Lines. *J. Biol. Chem.* 277, 49127–49133.
- Hurbin, A., Coll, J.-L., Dubrez-Daloz, L., Mari, B., Auberger, P., Brambilla, C., and Favrot, M.-C. (2005). Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 280, 19757–19767.
- Husain, A.N., Colby, T., Ordonez, N., Krausz, T., Attanoos, R., Beasley, M.B., Borczuk, A.C., Butnor, K., Cagle, P.T., Chirieac, L.R., et al. (2013). Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma: 2012 Update of the Consensus Statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 137, 647–667.

- Hwang, E., Ryu, K.-S., Pääkkönen, K., Güntert, P., Cheong, H.-K., Lim, D.-S., Lee, J.-O., Jeon, Y.H., and Cheong, C. (2007). Structural insight into dimeric interaction of the SARAH domains from Mst1 and RASSF family proteins in the apoptosis pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 9236–9241.
- Hylebos, M., Van Camp, G., van Meerbeeck, J.P., and Op de Beeck, K. (2016). The Genetic Landscape of Malignant Pleural Mesothelioma: Results from Massively Parallel Sequencing. *J. Thorac. Oncol.* *11*, 1615–1626.
- Hysi, I., Porte, H., Renier, A., Le Pimpec-Barthes, F., Scherpereel, A., Copin, M.-C., Hofman, P., Gallateau-Sallé, F., Zucman-Rossi, J., and Jaurand, M.-C. (2014). Classification moléculaire des mésothéliomes en sous-groupes tumoraux. *Chir. Thorac. Cardio-Vasc.* *18*, 225–229.
- Inai (2010). Aberrant promoter methylation of WIF-1 and SFRP1, 2, 4 genes in mesothelioma. *Oncol. Rep.* *24*.
- Ishikawa, N., Daigo, Y., Takano, A., Taniwaki, M., Kato, T., Hayama, S., Murakami, H., Takeshima, Y., Inai, K., Nishimura, H., et al. (2005). Increases of Amphiregulin and Transforming Growth Factor- α in Serum as Predictors of Poor Response to Gefitinib among Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancers. *Cancer Res.* *65*, 9176–9184.
- Isokane, M., Hieda, M., Hirakawa, S., Shudou, M., Nakashiro, K., Hashimoto, K., Hamakawa, H., and Higashiyama, S. (2008). Plasma-membrane-anchored growth factor pro-amphiregulin binds A-type lamin and regulates global transcription. *J Cell Sci* *121*, 3608–3618.
- Jacobs, B., De Roock, W., Piessevaux, H., Van Oirbeek, R., Biesmans, B., De Schutter, J., Fieuws, S., Vandesompele, J., Peeters, M., Van Laethem, J.-L., et al. (2009). Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 5068–5074.
- Jagadeeswaran, R., Ma, P.C., Seiwert, T.Y., Jagadeeswaran, S., Zumba, O., Nallasura, V., Ahmed, S., Filiberti, R., Paganuzzi, M., Puntoni, R., et al. (2006). Functional Analysis of c-Met/Hepatocyte Growth Factor Pathway in Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Res.* *66*, 352–361.
- Jagannathan, R., Schimizzi, G.V., Zhang, K., Loza, A.J., Yabuta, N., Nojima, H., and Longmore, G.D. (2016). AJUBA LIM Proteins Limit Hippo Activity in Proliferating Cells by Sequestering the Hippo Core Kinase Complex in the Cytosol. *Mol. Cell. Biol.* *36*, 2526–2542.
- Jamieson, A.M., Pasman, L., Yu, S., Gamradt, P., Homer, R.J., Decker, T., and Medzhitov, R. (2013). Role of tissue protection in lethal respiratory viral-bacterial coinfection. *Science* *340*, 1230–1234.
- Jang, S.-W., Yang, S.-J., Srinivasan, S., and Ye, K. (2007). Akt Phosphorylates Mst1 and Prevents Its Proteolytic Activation, Blocking FOXO3 Phosphorylation and Nuclear Translocation. *J. Biol. Chem.* *282*, 30836–30844.
- Janse van Rensburg, H.J., and Yang, X. (2016). The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis. *Cell. Signal.* *28*, 1761–1772.
- Jean, D., Daubriac, J., Le Pimpec-Barthes, F., Galateau-Salle, F., and Jaurand, M.-C. (2012). Molecular Changes in Mesothelioma With an Impact on Prognosis and Treatment. *Arch. Pathol. Lab. Med.* *136*, 277–293.
- Jing, C., Jin, Y.H., You, Z., Qiong, Q., and Jun, Z. (2016). Prognostic value of amphiregulin and epiregulin mRNA expression in metastatic colorectal cancer patients. *Oncotarget* *7*, 55890–55899.
- Jing, F., Kim, H.J., Kim, C.H., Kim, Y.J., Lee, J.H., and Kim, H.R. (2015). Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *Int. J. Oncol.* *46*, 1582–1588.
- Joffre, C., Dupont, N., Hoa, L., Gomez, V., Pardo, R., Gonçalves-Pimentel, C., Achard, P., Bettoun, A., Meunier, B., Bauvy, C., et al. (2015). The Pro-apoptotic STK38 Kinase Is a New Beclin1 Partner Positively Regulating Autophagy. *Curr. Biol.* *25*, 2479–2492.
- Johnson, R., and Halder, G. (2014). The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 63.
- Johnson, G.R., Saeki, T., Auersperg, N., Gordon, A.W., Shoyab, M., Salomon, D.S., and Stromberg, K. (1991). Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelial cells: Nuclear localization of endogenous amphiregulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *180*, 481–488.
- Jung, S., Kang, J.G., Lee, J.H., Song, K.J., Ko, J.H., and Kim, Y.S. (2014). PHLPP1 regulates contact inhibition by dephosphorylating Mst1 at the inhibitory site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *443*, 1263–1269.

- Kaan, H.Y.K., Chan, S.W., Tan, S.K.J., Guo, F., Lim, C.J., Hong, W., and Song, H. (2017). Crystal structure of TAZ-TEAD complex reveals a distinct interaction mode from that of YAP-TEAD complex. *Sci. Rep.* 7.
- Kadota, K., Suzuki, K., Colovos, C., Sima, C.S., Rusch, V.W., Travis, W.D., and Adusumilli, P.S. (2012). A nuclear grading system is a strong predictor of survival in epitheloid diffuse malignant pleural mesothelioma. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* 25, 260–271.
- Kang, H.C., Kim, H.K., Lee, S., Mendez, P., Kim, J.W., Woodard, G., Yoon, J.-H., Jen, K.-Y., Fang, L.T., Jones, K., et al. (2016). Whole exome and targeted deep sequencing identify genome-wide allelic loss and frequent SETDB1 mutations in malignant pleural mesotheliomas. *Oncotarget* 7, 8321–8331.
- Kansra, S., Stoll, S.W., Johnson, J.L., and Elder, J.T. (2004). Autocrine Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Activation in Normal Human Keratinocytes: Metalloproteinase-mediated Release of Amphiregulin Triggers Signaling from ErbB1 to ERK. *Mol. Biol. Cell* 15, 4299–4309.
- Katagiri, K., Katakai, T., Ebisuno, Y., Ueda, Y., Okada, T., and Kinashi, T. (2009). Mst1 controls lymphocyte trafficking and interstitial motility within lymph nodes. *EMBO J.* 28, 1319–1331.
- Kawaguchi, K., Murakami, H., Taniguchi, T., Fujii, M., Kawata, S., Fukui, T., Kondo, Y., Osada, H., Usami, N., Yokoi, K., et al. (2009). Combined inhibition of MET and EGFR suppresses proliferation of malignant mesothelioma cells. *Carcinogenesis* 30, 1097–1105.
- Khambata-Ford, S., Garrett, C.R., Meropol, N.J., Basik, M., Harbison, C.T., Wu, S., Wong, T.W., Huang, X., Takimoto, C.H., Godwin, A.K., et al. (2007). Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 3230–3237.
- Kim, N.-G., and Gumbiner, B.M. (2015). Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK–Src–PI3K pathway. *J Cell Biol* 210, 503–515.
- Kim, S.-T., Lim, D.-S., Canman, C.E., and Kastan, M.B. (1999). Substrate Specificities and Identification of Putative Substrates of ATM Kinase Family Members. *J. Biol. Chem.* 274, 37538–37543.
- Kim, S.-Y., Tachioka, Y., Mori, T., and Hakoshima, T. (2016). Structural basis for autoinhibition and its relief of MOB1 in the Hippo pathway. *Sci. Rep.* 6.
- Kim, T., Yang, S.-J., Hwang, D., Song, J., Kim, M., Kyum Kim, S., Kang, K., Ahn, J., Lee, D., Kim, M., et al. (2015). A basal-like breast cancer-specific role for SRF–IL6 in YAP-induced cancer stemness. *Nat. Commun.* 6.
- de Klerk, N., Alfonso, H., Olsen, N., Reid, A., Sleith, J., Palmer, L., Berry, G., and Musk, A.B. (2013). Familial aggregation of malignant mesothelioma in former workers and residents of Wittenoom, Western Australia. *Int. J. Cancer* 132, 1423–1428.
- Köchler, R., Hu, X.W., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2006). Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic Cph. Den.* 7, 129–145.
- Kohler, R.S., Schmitz, D., Cornils, H., Hemmings, B.A., and Hergovich, A. (2010). Differential NDR/LATS Interactions with the Human MOB Family Reveal a Negative Role for Human MOB2 in the Regulation of Human NDR Kinases. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4507–4520.
- Kumar-Singh, S., Weyler, J., Martin, M.J., Vermeulen, P.B., and Van Marck, E. (1999). Angiogenic cytokines in mesothelioma: a study of VEGF, FGF-1 and -2, and TGF beta expression. *J. Pathol.* 189, 72–78.
- Ladanyi, M., Zauderer, M.G., Krug, L.M., Ito, T., McMillan, R., Bott, M., and Giancotti, F. (2012). New Strategies in Pleural Mesothelioma: BAP1 and NF2 as Novel Targets for Therapeutic Development and Risk Assessment. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 4485–4490.
- LaFave, L.M., Béguelin, W., Koche, R., Teater, M., Spitzer, B., Chramiec, A., Papalexi, E., Keller, M.D., Hricik, T., Konstantinoff, K., et al. (2015). Loss of BAP1 function leads to EZH2-dependent transformation. *Nat. Med.* 21, 1344–1349.
- Lallemant, D. (2003). NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev.* 17, 1090–1100.
- Lamber, E.P., Horwitz, A.A., and Parvin, J.D. (2010). BRCA1 represses Amphiregulin gene expression. *Cancer Res.* 70, 996–1005.

- Lapi, E., Di Agostino, S., Donzelli, S., Gal, H., Domany, E., Rechavi, G., Pandolfi, P.P., Givol, D., Strano, S., Lu, X., et al. (2008). PML, YAP, and p73 are components of a proapoptotic autoregulatory feedback loop. *Mol. Cell* 32, 803–814.
- Le Stang, N., Belot, A., Gilg Soit Ilg, A., Rolland, P., Astoul, P., Bara, S., Brochard, P., Danzon, A., Delafosse, P., Grosclaude, P., et al. (2010). Evolution of pleural cancers and malignant pleural mesothelioma incidence in France between 1980 and 2005: Evolution of Pleural Cancers in France. *Int. J. Cancer* 126, 232–238.
- Lee, A.Y., Raz, D.J., He, B., and Jablons, D.M. (2007). Update on the molecular biology of malignant mesothelioma. *Cancer* 109, 1454–1461.
- Lee, K.-K., Ohyama, T., Yajima, N., Tsubuki, S., and Yonehara, S. (2001). MST, a Physiological Caspase Substrate, Highly Sensitizes Apoptosis Both Upstream and Downstream of Caspase Activation. *J. Biol. Chem.* 276, 19276–19285.
- Lee, M.-G., Jeong, S.-I., Ko, K.-P., Park, S.-K., Ryu, B.-K., Kim, I.-Y., Kim, J.-K., and Chi, S.-G. (2016). RASSF1A Directly Antagonizes RhoA Activity through the Assembly of a Smurf1-Mediated Destruction Complex to Suppress Tumorigenesis. *Cancer Res.* 76, 1847–1859.
- Lehtinen, M.K., Yuan, Z., Boag, P.R., Yang, Y., Villén, J., Becker, E.B.E., DiBacco, S., Iglesia, N. de la, Gygi, S., Blackwell, T.K., et al. (2006). A Conserved MST-FOXO Signaling Pathway Mediates Oxidative-Stress Responses and Extends Life Span. *Cell* 125, 987–1001.
- Levallet, G., Vaisse-Lesteven, M., Stang, N.L., Ilg, A.G.S., Brochard, P., Astoul, P., Pairen, J.C., Bergot, E., Zalcmann, G., and Galateau-Sallé, F. (2012). 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.
- Levano, K.S., and Kenny, P.A. (2012). Clarification of the C-terminal proteolytic processing site of human Amphiregulin. *FEBS Lett.* 586, 3500–3502.
- Levin, P.A., and Dowell, J.E. (2017). Spotlight on bevacizumab and its potential in the treatment of malignant pleural mesothelioma: the evidence to date. *OncoTargets Ther.* 10, 2057–2066.
- Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.
- Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N., and Shaul, Y. (2008). Yap1 Phosphorylation by c-Abl Is a Critical Step in Selective Activation of Proapoptotic Genes in Response to DNA Damage. *Mol. Cell* 29, 350–361.
- Li, X., and Fan, H. (2004). Loss of Ectodomain Shedding Due to Mutations in the Metalloprotease and Cysteine-rich/Disintegrin Domains of the Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme (TACE). *J. Biol. Chem.* 279, 27365–27375.
- Li, C.-Y., Lu, H., Hu, J., Lan, J., Galicia, N., Klein, O.D., and Du, W. (2016a). α E-catenin inhibits YAP/TAZ activity to regulate signalling centre formation during tooth development. *Nat. Commun.* 7, 12133.
- Li, P., Silvis, M.R., Honaker, Y., Lien, W.-H., Arron, S.T., and Vasioukhin, V. (2016b). α E-catenin inhibits a Src–YAP1 oncogenic module that couples tyrosine kinases and the effector of Hippo signaling pathway. *Genes Dev.* 30, 798–811.
- Li, S., Plowman, G.D., Buckley, S.D., and Shipley, G.D. (1992). Heparin inhibition of autonomous growth implicates amphiregulin as an autocrine growth factor for normal human mammary epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 153, 103–111.
- Li, X., Ma, X., Chen, L., Gu, L., Zhang, Y., Zhang, F., Ouyang, Y., Gao, Y., Huang, Q., and Zhang, X. (2015a). Prognostic value of CD44 expression in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 5.
- Li, X.-D., Miao, S.-Y., Wang, G.-L., Yang, L., Shu, Y.-Q., and Yin, Y.-M. (2010). Amphiregulin and Epiregulin Expression in Colorectal Carcinoma and the Correlation with Clinicopathological Characteristics. *Oncol. Res. Treat.* 33, 353–358.
- Li, Y., Zhou, H., Li, F., Chan, S.W., Lin, Z., Wei, Z., Yang, Z., Guo, F., Lim, C.J., Xing, W., et al. (2015b). Angiotensin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Res.* 25, 801–817.
- Lin, L., Sabnis, A.J., Chan, E., Olivas, V., Cade, L., Pazarentzos, E., Asthana, S., Neel, D., Yan, J.J., Lu, X., et al. (2015). The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat. Genet.* 47, 250–256.

- Lin, X., Cai, F., Li, X., Kong, X., Xu, C., Zuo, X., and Yang, Q. (2013). Prognostic significance of mammalian sterile 20-like kinase 1 in breast cancer. *Tumor Biol.* 34, 3239–3243.
- Lin, Y., Khokhlatchev, A., Figeys, D., and Avruch, J. (2002). Death-associated Protein 4 Binds MST1 and Augments MST1-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 47991–48001.
- Lindquist, D., Ahrlund-Richter, A., Tarján, M., Tot, T., and Dalianis, T. (2012). Intense CD44 expression is a negative prognostic factor in tonsillar and base of tongue cancer. *Anticancer Res.* 32, 153–161.
- Liu, Z., and Klominek, J. (2003). Regulation of matrix metalloprotease activity in malignant mesothelioma cell lines by growth factors. *Thorax* 58, 198–203.
- Liu, Z., and Klominek, J. (2004). Chemotaxis and chemokinesis of malignant mesothelioma cells to multiple growth factors. *Anticancer Res.* 24, 1625–1630.
- Liu, C.-Y., Zha, Z.-Y., Zhou, X., Zhang, H., Huang, W., Zhao, D., Li, T., Chan, S.W., Lim, C.J., Hong, W., et al. (2010). The Hippo Tumor Pathway Promotes TAZ Degradation by Phosphorylating a Phosphodegron and Recruiting the SCF β -TrCP E3 Ligase. *J. Biol. Chem.* 285, 37159–37169.
- Liu, L., Tommasi, S., Lee, D.-H., Dammann, R., and Pfeifer, G.P. (2003). Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene* 22, 8125–8136.
- Lo Iacono, M., Monica, V., Righi, L., Grosso, F., Libener, R., Vatrano, S., Bironzo, P., Novello, S., Musmeci, L., Volante, M., et al. (2015). Targeted Next-Generation Sequencing of Cancer Genes in Advanced Stage Malignant Pleural Mesothelioma: A Retrospective Study. *J. Thorac. Oncol.* 10, 492–499.
- López-Ríos, F., Illei, P.B., Rusch, V., and Ladanyi, M. (2004). Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *The Lancet* 364, 1157–1166.
- Luo, X., Li, Z., Yan, Q., Li, X., Tao, D., Wang, J., Leng, Y., Gardner, K., Judge, S.I.V., Li, Q.Q., et al. (2009). The human WW45 protein enhances MST1-mediated apoptosis in vivo. *Int. J. Mol. Med.* 23, 357–362.
- Lv, X.-B., Liu, C.-Y., Wang, Z., Sun, Y.-P., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., and Guan, K.-L. (2015). PARD3 induces TAZ activation and cell growth by promoting LATS1 and PP1 interaction. *EMBO Rep.* 16, 975–985.
- Ma, X., Zhang, H., Xue, X., and Shah, Y.M. (2017). Hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) promotes colon cancer growth by potentiating Yes-associated protein 1 (YAP1) activity. *J. Biol. Chem.* 292, 17046–17056.
- Maejima, Y., Kyo, S., Zhai, P., Liu, T., Li, H., Ivessa, A., Sciarretta, S., Del Re, D.P., Zablocki, D.K., Hsu, C.-P., et al. (2013). Mst1 inhibits autophagy by promoting Beclin1-Bcl-2 interaction. *Nat. Med.* 19, 1478–1488.
- Mao, X., Li, P., Wang, Y., Liang, Z., Liu, J., Li, J., Jiang, Y., Bao, G., Li, L., Zhu, B., et al. (2017). CRB3 regulates contact inhibition by activating the Hippo pathway in mammary epithelial cells. *Cell Death Dis.* 8, e2546.
- Marinaccio, A., Binazzi, A., Cauzillo, G., Cavone, D., Zotti, R.D., Ferrante, P., Gennaro, V., Gorini, G., Menegozzo, M., Mensi, C., et al. (2007). Analysis of latency time and its determinants in asbestos related malignant mesothelioma cases of the Italian register. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 43, 2722–2728.
- Martensson, G., Thylen, A., Lindquist, U., and Hjerpe, A. (1994). The sensitivity of hyaluronan analysis of pleural fluid from patients with malignant mesothelioma and a comparison of different methods. *Cancer* 73, 1406–1410.
- Masago, K., Fujita, S., Hatachi, Y., Fukuhara, A., Sakuma, K., Ichikawa, M., Kim, Y.H., Mio, T., and Mishima, M. (2008). Clinical significance of pretreatment serum amphiregulin and transforming growth factor- α , and an epidermal growth factor receptor somatic mutation in patients with advanced non-squamous, non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 99, 2295–2301.
- Matallanas, D., Romano, D., Yee, K., Meissl, K., Kucerova, L., Piazzolla, D., Baccarini, M., Vass, J.K., Kolch, W., and O'Neill, E. (2007). RASSF1A Elicits Apoptosis through an MST2 Pathway Directing Proapoptotic Transcription by the p73 Tumor Suppressor Protein. *Mol. Cell* 27, 962–975.
- Máthé, E. (2004). RASSF1A, the new guardian of mitosis. *Nat. Genet.* 36, 117–118.
- Matsui, M., Miyasaka, J., Hamada, K., Ogawa, Y., Hiramoto, M., Fujimori, R., and Aoi, A. (2000). Influence of aging and cell senescence on telomerase activity in keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 22, 80–87.

- Matullo, G., Guarrera, S., Betti, M., Fiorito, G., Ferrante, D., Voglino, F., Cadby, G., Di Gaetano, C., Rosa, F., Russo, A., et al. (2013). Genetic Variants Associated with Increased Risk of Malignant Pleural Mesothelioma: A Genome-Wide Association Study. *PLoS ONE* 8.
- Mauviel, A., Nallet-Staub, F., and Varelas, X. (2012). Integrating developmental signals: a Hippo in the (path)way. *Oncogene* 31, 1743–1756.
- Meerang, M., Bérard, K., Friess, M., Bitanhirwe, B.K.Y., Soltermann, A., Vrugt, B., Felley-Bosco, E., Bueno, R., Richards, W.G., Seifert, B., et al. (2016). Low Merlin expression and high Survivin labeling index are indicators for poor prognosis in patients with malignant pleural mesothelioma. *Mol. Oncol.* 10, 1255–1265.
- Menashi, S., Serova, M., Ma, L., Vignot, S., Mourah, S., and Calvo, F. (2003). Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells. *Cancer Res.* 63, 7575–7580.
- Meng, Z., Moroishi, T., Mottier-Pavie, V., Plouffe, S.W., Hansen, C.G., Hong, A.W., Park, H.W., Mo, J.-S., Lu, W., Lu, S., et al. (2015). MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat. Commun.* 6, 8357.
- Meng, Z., Moroishi, T., and Guan, K.-L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* 30, 1–17.
- Metintas, S., Metintas, M., Ucgun, I., and Oner, U. (2002). Malignant Mesothelioma due to Environmental Exposure to Asbestos. *Chest* 122, 2224–2229.
- Metz-Flamant, C., Guseva Canu, I., and Laurier, D. (2011). Malignant pleural mesothelioma risk among nuclear workers: a review. *J. Radiol. Prot. Off. J. Soc. Radiol. Prot.* 31, 9–23.
- Meulenbroeks, C., Weelden, H. van, Schwartz, C., Voehringer, D., Redegeld, F.A.M., Rutten, V.P.M.G., Willemse, T., Sijts, A.J.A.M., and Zaiss, D.M.W. (2015). Basophil-Derived Amphiregulin Is Essential for UVB Irradiation-Induced Immune Suppression. *J. Invest. Dermatol.* 135, 222–228.
- Mezzapelle, R., Miglio, U., Rena, O., Paganotti, A., Allegrini, S., Antona, J., Molinari, F., Frattini, M., Monga, G., Alabiso, O., et al. (2013). Mutation analysis of the EGFR gene and downstream signalling pathway in histologic samples of malignant pleural mesothelioma. *Br. J. Cancer* 108, 1743–1749.
- Mi, W., Lin, Q., Childress, C., Sudol, M., Robishaw, J., Berlot, C.H., Shabahang, M., and Yang, W. (2015). Geranylgeranylation signals to the Hippo pathway for breast cancer cell proliferation and migration. *Oncogene* 34, 3095.
- Michaloglou, C., Lehmann, W., Martin, T., Delaunay, C., Hueber, A., Barys, L., Niu, H., Billy, E., Wartmann, M., Ito, M., et al. (2013). The Tyrosine Phosphatase PTPN14 Is a Negative Regulator of YAP Activity. *PLoS ONE* 8.
- Michgehl, U., Pavenstädt, H., and Vollenbröcker, B. (2017). Cross talk between the Crumbs complex and Hippo signaling in renal epithelial cells. *Pflug. Arch. - Eur. J. Physiol.* 469, 917–926.
- Miletti-González, K.E., Murphy, K., Kumaran, M.N., Ravindranath, A.K., Wernyj, R.P., Kaur, S., Miles, G.D., Lim, E., Chan, R., Chekmareva, M., et al. (2012). Identification of Function for CD44 Intracytoplasmic Domain (CD44-ICD). *J. Biol. Chem.* 287, 18995–19007.
- Minoo, P., Zlobec, I., Baker, K., Tornillo, L., Terracciano, L., Jass, J.R., and Lugli, A. (2007). Prognostic significance of mammalian sterile20-like kinase 1 in colorectal cancer. *Mod. Pathol.* 20, 331–338.
- Miozzi, E., Rapisarda, V., Marconi, A., Costa, C., Polito, I., Spandidos, D., Libra, M., and Fenga, C. (2015). Fluoro-edenite and carbon nanotubes: The health impact of ‘asbestos-like’ fibres (Review). *Exp. Ther. Med.*
- Misra, S., Ghatak, S., and Toole, B.P. (2005). Regulation of MDR1 Expression and Drug Resistance by a Positive Feedback Loop Involving Hyaluronan, Phosphoinositide 3-Kinase, and ErbB2. *J. Biol. Chem.* 280, 20310–20315.
- Mitra, S.K., and Schlaepfer, D.D. (2006). Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 516–523.
- Miyayama, A., Masuda, M., Tsuta, K., Kawasaki, K., Nakamura, Y., Sakuma, T., Asamura, H., Gemma, A., and Yamada, T. (2015). Hippo Pathway Gene Mutations in Malignant Mesothelioma: Revealed by RNA and Targeted Exon Sequencing. *J. Thorac. Oncol.* 10, 844–851.

- Mo, J.-S., Meng, Z., Kim, Y.C., Park, H.W., Hansen, C.G., Kim, S., Lim, D.-S., and Guan, K.-L. (2015). Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat. Cell Biol.* *17*, 500–510.
- Monticelli, L.A., Sonnenberg, G.F., Abt, M.C., Alenghat, T., Ziegler, C.G.K., Doering, T.A., Angelosanto, J.M., Laidlaw, B.J., Yang, C.Y., Sathaliyawala, T., et al. (2011). Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection. *Nat. Immunol.* *12*, 1045–1054.
- Moroishi, T., Park, H.W., Qin, B., Chen, Q., Meng, Z., Plouffe, S.W., Taniguchi, K., Yu, F.-X., Karin, M., Pan, D., et al. (2015). A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev.* *29*, 1271–1284.
- Morrison, H., Sherman, L.S., Legg, J., Banine, F., Isacke, C., Haipek, C.A., Gutmann, D.H., Ponta, H., and Herrlich, P. (2001). The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev.* *15*, 968–980.
- Murakami, H., Mizuno, T., Taniguchi, T., Fujii, M., Ishiguro, F., Fukui, T., Akatsuka, S., Horio, Y., Hida, T., Kondo, Y., et al. (2011). LATS2 Is a Tumor Suppressor Gene of Malignant Mesothelioma. *Cancer Res.* *71*, 873–883.
- Murphy, G. (2009). Regulation of the proteolytic disintegrin metalloproteinases, the ‘Sheddases.’ *Semin. Cell Dev. Biol.* *20*, 138–145.
- Nagano, O., and Saya, H. (2004). Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci.* *95*, 930–935.
- Nakamura, M., Zhai, P., Del Re, D.P., Maejima, Y., and Sadoshima, J. (2016). Mst1-mediated phosphorylation of Bcl-xL is required for myocardial reperfusion injury. *JCI Insight* *1*.
- Nallet-Staub, F., Marsaud, V., Li, L., Gilbert, C., Dodier, S., Bataille, V., Sudol, M., Herlyn, M., and Mauviel, A. (2014). Pro-Invasive Activity of the Hippo Pathway Effectors YAP and TAZ in Cutaneous Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* *134*, 123–132.
- Naor, D., Sionov, R.V., and Ish-Shalom, D. (1997). CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv. Cancer Res.* *71*, 241–319.
- Nehme, N.T., Schmid, J.P., Debeurme, F., André-Schmutz, I., Lim, A., Nitschke, P., Rieux-Laucat, F., Lutz, P., Picard, C., Mahlaoui, N., et al. (2012). MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. *Blood* *119*, 3458–3468.
- Nelson, D.B., Rice, D.C., Niu, J., Atay, S., Vaporciyan, A.A., Antonoff, M., Hofstetter, W.L., Walsh, G.L., Swisher, S.G., Roth, J.A., et al. (2017). Long-Term Survival Outcomes of Cancer-Directed Surgery for Malignant Pleural Mesothelioma: Propensity Score Matching Analysis. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *35*, 3354–3362.
- Nguyen, H.B., Babcock, J.T., Wells, C.D., and Quilliam, L.A. (2013). LKB1 tumor suppressor regulates AMP kinase/mTOR-independent cell growth and proliferation via the phosphorylation of Yap. *Oncogene* *32*, 4100–4109.
- Ni, L., Zheng, Y., Hara, M., Pan, D., and Luo, X. (2015). Structural basis for Mob1-dependent activation of the core Mst–Lats kinase cascade in Hippo signaling. *Genes Dev.* *29*, 1416–1431.
- Nishi, E., Hiraoka, Y., Yoshida, K., Okawa, K., and Kita, T. (2006). Nardilysin Enhances Ectodomain Shedding of Heparin-binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor through Activation of Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme. *J. Biol. Chem.* *281*, 31164–31172.
- Nowak, A.K., Chansky, K., Rice, D.C., Pass, H.I., Kindler, H.L., Shemanski, L., Billé, A., Rintoul, R.C., Batirel, H.F., Thomas, C.F., et al. (2016). The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for Revisions of the T Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* *11*, 2089–2099.
- Nuvoli, B., Germoni, S., Morosetti, C., Santoro, R., Cortese, G., Masi, S., Cordone, I., and Galati, R. (2014). Exemestane blocks mesothelioma growth through downregulation of cAMP, pCREB and CD44 implicating new treatment option in patients affected by this disease. *Mol. Cancer* *13*, 69.
- Oh, H.J., Lee, K.-K., Song, S.J., Jin, M.S., Song, M.S., Lee, J.H., Im, C.R., Lee, J.-O., Yonehara, S., and Lim, D.-S. (2006). Role of the Tumor Suppressor RASSF1A in Mst1-Mediated Apoptosis. *Cancer Res.* *66*, 2562–2569.

- Oh, H.J., Kim, M.J., Song, S.J., Kim, T., Lee, D., Kwon, S.-H., Choi, E.-J., and Lim, D.-S. (2010). MST1 Limits the Kinase Activity of Aurora B to Promote Stable Kinetochore-Microtubule Attachment. *Curr. Biol.* *20*, 416–422.
- Ohar, J.A., Cheung, M., Talarchek, J., Howard, S.E., Howard, T.D., Hesdorffer, M., Peng, H., Rauscher, F.J., and Testa, J.R. (2016). Germline BAP1 Mutational Landscape of Asbestos-Exposed Malignant Mesothelioma Patients with Family History of Cancer. *Cancer Res.* *76*, 206–215.
- Ohashi, R., Takahashi, F., Cui, R., Yoshioka, M., Gu, T., Sasaki, S., Tominaga, S., Nishio, K., Tanabe, K.K., and Takahashi, K. (2007). Interaction between CD44 and hyaluronate induces chemoresistance in non-small cell lung cancer cell. *Cancer Lett.* *252*, 225–234.
- Ohchi, T., Akagi, Y., Kinugasa, T., Kakuma, T., Kawahara, A., Sasatomi, T., Gotanda, Y., Yamaguchi, K., Tanaka, N., Ishibashi, Y., et al. (2012). Amphiregulin Is a Prognostic Factor in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* *32*, 2315–2321.
- Oka, T., Mazack, V., and Sudol, M. (2008). Mst2 and Lats Kinases Regulate Apoptotic Function of Yes Kinase-associated Protein (YAP). *J. Biol. Chem.* *283*, 27534–27546.
- Oka, T., Remue, E., Meerschaert, K., Vanloo, B., Boucherie, C., Gfeller, D., Bader, G.D., Sidhu, S.S., Vandekerckhove, J., Gettemans, J., et al. (2010). Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem. J.* *432*, 461–472.
- Oka, T., Schmitt, A.P., and Sudol, M. (2012). Opposing roles of angiotenin-like-1 and zona occludens-2 on pro-apoptotic function of YAP. *Oncogene* *31*, 128–134.
- Okamoto, I., Tsuiki, H., Kenyon, L.C., Godwin, A.K., Emlet, D.R., Holgado-Madruga, M., Lanham, I.S., Joynes, C.J., Vo, K.T., Guha, A., et al. (2002). Proteolytic Cleavage of the CD44 Adhesion Molecule in Multiple Human Tumors. *Am. J. Pathol.* *160*, 441–447.
- Okoye, I.S., Coomes, S.M., Pelly, V.S., Czieso, S., Papayannopoulos, V., Tolmachova, T., Seabra, M.C., and Wilson, M.S. (2014). MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity* *41*, 89–103.
- Orbán-Németh, Z., Simader, H., Badurek, S., Tranciková, A., and Propst, F. (2005). Microtubule-associated protein 1S, a short and ubiquitously expressed member of the microtubule-associated protein 1 family. *J. Biol. Chem.* *280*, 2257–2265.
- Orr, B.A., Bai, H., Odia, Y., Jain, D., Anders, R.A., and Eberhart, C.G. (2011). Yes-Associated Protein 1 (YAP1) Is Widely Expressed in Human Brain Tumors and Promotes Glioblastoma Growth. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *70*, 568–577.
- Ortega-Guerrero, M.A., Carrasco-Núñez, G., Barragán-Campos, H., and Ortega, M.R. (2015). High incidence of lung cancer and malignant mesothelioma linked to erionite fibre exposure in a rural community in Central Mexico. *Occup. Environ. Med.* *72*, 216–218.
- Oudhoff, M.J., Freeman, S.A., Couzens, A.L., Antignano, F., Kuznetsova, E., Min, P.H., Northrop, J.P., Lehnertz, B., Baryte-Lovejoy, D., Vedadi, M., et al. (2013). Control of the Hippo Pathway by Set7-Dependent Methylation of Yap. *Dev. Cell* *26*, 188–194.
- Pan, D. (2015). YAPing Hippo Forecasts a New Target for Lung Cancer Prevention and Treatment. *J. Clin. Oncol.* *33*, 2311–2313.
- Pass, H.I., Bocchetta, M., and Carbone, M. (2004). Evidence of an important role for SV40 in mesothelioma. *Thorac. Surg. Clin.* *14*, 489–495.
- Pearce, L.R., Komander, D., and Alessi, D.R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 9–22.
- Peng, M., and Wang, H. (2003). Embryology and gross structure. In: Light RW, Lee G, eds. *Textbook of pleural diseases*. Lond. Arnold 3–16.
- Perra, A., Kowalik, M.A., Ghiso, E., Ledda-Columbano, G.M., Di Tommaso, L., Angioni, M.M., Raschioni, C., Testore, E., Roncalli, M., Giordano, S., et al. (2014). YAP activation is an early event and a potential therapeutic target in liver cancer development. *J. Hepatol.* *61*, 1088–1096.
- Peto, J., Decarli, A., La Vecchia, C., Levi, F., and Negri, E. (1999). The European mesothelioma epidemic. *Br. J. Cancer* *79*, 666–672.

- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* *94*, 1287–1312.
- Pijuan-Galitó, S., Tamm, C., and Annerén, C. (2014). Serum Inter- α -inhibitor Activates the Yes Tyrosine Kinase and YAP/TEAD Transcriptional Complex in Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* *289*, 33492–33502.
- Pillappa, R., Maleszewski, J.J., Sukov, W.R., Bedroske, P.P., Greipp, P.T., Boland, J.M., Yi, E.S., Peikert, T., Aubry, M.C., and Roden, A.C. (2017). Loss of BAP1 Expression in Atypical Mesothelial Proliferations Helps to Predict Malignant Mesothelioma: *Am. J. Surg. Pathol.* *1*.
- Plouffe, S.W., Meng, Z., Lin, K.C., Lin, B., Hong, A.W., Chun, J.V., and Guan, K.-L. (2016). Characterization of Hippo Pathway Components by Gene Inactivation. *Mol. Cell* *64*, 993–1008.
- Plowman, G.D., Green, J.M., McDonald, V.L., Neubauer, M.G., Distech, C.M., Todaro, G.J., and Shoyab, M. (1990). The amphiregulin gene encodes a novel epidermal growth factor-related protein with tumor-inhibitory activity. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 1969–1981.
- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P.A. (2003). CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 33.
- Poon, C.L.C., Lin, J.I., Zhang, X., and Harvey, K.F. (2011). The Sterile 20-like Kinase Tao-1 Controls Tissue Growth by Regulating the Salvador-Warts-Hippo Pathway. *Dev. Cell* *21*, 896–906.
- Poulikakos, P.I., Xiao, G.-H., Gallagher, R., Jablonski, S., Jhanwar, S.C., and Testa, J.R. (2006). Re-expression of the tumor suppressor NF2/merlin inhibits invasiveness in mesothelioma cells and negatively regulates FAK. *Oncogene* *25*, 5960.
- Praskova, M., Xia, F., and Avruch, J. (2008). MOBKL1A/MOBKL1B Phosphorylation by MST1 and MST2 Inhibits Cell Proliferation. *Curr. Biol. CB* *18*, 311–321.
- Preisinger, C., Short, B., De Corte, V., Bruyneel, E., Haas, A., Kopajtich, R., Gettemans, J., and Barr, F.A. (2004). YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3 ζ . *J. Cell Biol.* *164*, 1009–1020.
- Qin, L., Tamasi, J., Raggatt, L., Li, X., Feyen, J.H.M., Lee, D.C., DiCicco-Bloom, E., and Partridge, N.C. (2005). Amphiregulin Is a Novel Growth Factor Involved in Normal Bone Development and in the Cellular Response to Parathyroid Hormone Stimulation. *J. Biol. Chem.* *280*, 3974–3981.
- Rabizadeh, S., Xavier, R.J., Ishiguro, K., Bernabeortiz, J., Lopez-Ilasaca, M., Khokhlatchev, A., Mollahan, P., Pfeifer, G.P., Avruch, J., and Seed, B. (2004). The scaffold protein CNK1 interacts with the tumor suppressor RASSF1A and augments RASSF1A-induced cell death. *J. Biol. Chem.* *279*, 29247–29254.
- Rawat, S.J., and Chernoff, J. (2015). Regulation of mammalian Ste20 (Mst) kinases. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 149–156.
- Reeves, M.E., Baldwin, S.W., Baldwin, M.L., Chen, S.-T., Moretz, J.M., Aragon, R.J., Li, X., Strong, D.D., Mohan, S., and Ameer, Y.G. (2010). Ras-association domain family 1C protein promotes breast cancer cell migration and attenuates apoptosis. *BMC Cancer* *10*, 562.
- Remue, E., Meerschaert, K., Oka, T., Boucherie, C., Vandekerckhove, J., Sudol, M., and Gettemans, J. (2010). TAZ interacts with zonula occludens-1 and -2 proteins in a PDZ-1 dependent manner. *FEBS Lett.* *584*, 4175–4180.
- Rice, D., Chansky, K., Nowak, A., Pass, H., Kindler, H., Shemanski, L., Opitz, I., Call, S., Hasegawa, S., Kernstine, K., et al. (2016). The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for Revisions of the N Descriptors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification for Pleural Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* *11*, 2100–2111.
- Richter, A.M., Pfeifer, G.P., and Dammann, R.H. (2009). The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* *1796*, 114–128.
- Robinson, B.M. (2012). Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective. *Ann. Cardiothorac. Surg.* *1*, 491.
- Rodland, K.D., Bollinger, N., Ippolito, D., Opresko, L.K., Coffey, R.J., Zangar, R., and Wiley, H.S. (2008). Multiple Mechanisms Are Responsible for Transactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor in Mammary Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* *283*, 31477.

- Rogers, S.J., Box, C., Chambers, P., Barbachano, Y., Nutting, C.M., Rhys-Evans, P., Workman, P., Harrington, K.J., and Eccles, S.A. (2009). Determinants of response to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J. Pathol.* *218*, 122–130.
- Rosenbluh, J., Nijhawan, D., Cox, A.G., Li, X., Neal, J.T., Schafer, E.J., Zack, T.I., Wang, X., Tsherniak, A., Schinzel, A.C., et al. (2012). β -catenin driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell* *151*, 1457–1473.
- Royston, P., and Sauerbrei, W. (2004). A new measure of prognostic separation in survival data. *Stat. Med.* *23*, 723–748.
- Ruffié, P., and Margery, J. (2007). Cancer et environnement: le cas de l'amiante. *Oncologie* *9*, 335–339.
- Rusch, V.W., Chansky, K., Kindler, H.L., Nowak, A.K., Pass, H.I., Rice, D.C., Shemanski, L., Galateau-Sallé, F., McCaughan, B.C., Nakano, T., et al. (2016). The IASLC Mesothelioma Staging Project: Proposals for the M Descriptors and for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Mesothelioma. *J. Thorac. Oncol.* *11*, 2112–2119.
- Sakurai, H., Barros, E.J., Tsukamoto, T., Barasch, J., and Nigam, S.K. (1997). An in vitro tubulogenesis system using cell lines derived from the embryonic kidney shows dependence on multiple soluble growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6279–6284.
- Sánchez-Sanz, G., Matallanas, D., Nguyen, L.K., Kholodenko, B.N., Rosta, E., Kolch, W., and Buchete, N.-V. (2016). MST2-RASSF protein-protein interactions through SARA domains. *Brief. Bioinform.* *17*, 593–602.
- Santi, C.D., Melaiu, O., Bonotti, A., Cascione, L., Leva, G.D., Foddìs, R., Cristaudo, A., Lucchi, M., Mora, M., Truini, A., et al. (2017). Deregulation of miRNAs in malignant pleural mesothelioma is associated with prognosis and suggests an alteration of cell metabolism. *Sci. Rep.* *7*, 3140.
- Schagdarsurengin, U., Gimm, O., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Pfeifer, G.P., and Dammann, R. (2002). Frequent Epigenetic Silencing of the CpG Island Promoter of RASSF1A in Thyroid Carcinoma. *Cancer Res.* *62*, 3698–3701.
- Scherpereel, A. (2006). [The experts' conference of the Société de Pneumologie de Langue Française (SPLF) on malignant pleural mesothelioma (MPM): useful and necessary recommendations]. *Rev. Mal. Respir.* *23*, 11S5-6.
- Scherpereel, A. (2017). Malignant pleural mesothelioma: new treatments, new hopes? *Eur. Respir. J.* *49*, 1700319.
- Schildgen, V., Pabst, O., Tillmann, R.-L., Lüsebrink, J., Schildgen, O., Ludwig, C., Brockmann, M., and Stoelben, E. (2015). Low frequency of EGFR mutations in pleural mesothelioma patients, Cologne, Germany. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. AIMM* *23*, 118–125.
- Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszek, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., et al. (2011). Yap1 acts downstream of α -catenin to control epidermal proliferation. *Cell* *144*, 782–795.
- Schuger, L., Skubitz, A.P., Gilbride, K., Mandel, R., and He, L. (1996). Laminin and heparan sulfate proteoglycan mediate epithelial cell polarization in organotypic cultures of embryonic lung cells: evidence implicating involvement of the inner globular region of laminin beta 1 chain and the heparan sulfate groups of heparan sulfate proteoglycan. *Dev. Biol.* *179*, 264–273.
- Seidel, C., Schagdarsurengin, U., Blümke, K., Würfl, P., Pfeifer, G.P., Hauptmann, S., Taubert, H., and Dammann, R. (2007). Frequent hypermethylation of MST1 and MST2 in soft tissue sarcoma. *Mol. Carcinog.* *46*, 865–871.
- Sekido, Y. (2011). Inactivation of Merlin in malignant mesothelioma cells and the Hippo signaling cascade dysregulation: Merlin inactivation in mesothelioma. *Pathol. Int.* *61*, 331–344.
- Sekido, Y. (2013). Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis* *34*, 1413–1419.
- Sekido, Y., Pass, H.I., Bader, S., Mew, D.J., Christman, M.F., Gazdar, A.F., and Minna, J.D. (1995). Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res.* *55*, 1227–1231.
- Servas, C., Kiehmeier, S., Hach, J., Gross, R., Götz, C., and Montenarh, M. (2017). The mammalian STE20-like kinase 1 (MST1) is a substrate for the apoptosis inhibiting protein kinase CK2. *Cell. Signal.* *36*, 163–175.

- Shivakumar, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R., and White, M.A. (2002). The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4309–4318.
- Shoyab, M., Plowman, G.D., McDonald, V.L., Bradley, J.G., and Todaro, G.J. (1989). Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 243, 1074–1076.
- Shukuya, T., Serizawa, M., Watanabe, M., Akamatsu, H., Abe, M., Imai, H., Tokito, T., Ono, A., Taira, T., Kenmotsu, H., et al. (2014). Identification of actionable mutations in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer Amst. Neth.* 86, 35–40.
- Silvis, M.R., Kreger, B.T., Lien, W.-H., Klezovitch, O., Rudakova, G.M., Camargo, F.D., Lantz, D.M., Seykora, J.T., and Vasioukhin, V. (2011). α -catenin is a tumor suppressor that controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci. Signal.* 4, ra33.
- Sneddon, S., Leon, J.S., Dick, I.M., Cadby, G., Olsen, N., Brims, F., Allcock, R.J.N., Moses, E.K., Melton, P.E., de Klerk, N., et al. (2015). Absence of germline mutations in BAP1 in sporadic cases of malignant mesothelioma. *Gene* 563, 103–105.
- So, W.-K., Fan, Q., Lau, M.-T., Qiu, X., Cheng, J.-C., and Leung, P.C.K. (2014). Amphiregulin induces human ovarian cancer cell invasion by down-regulating E-cadherin expression. *FEBS Lett.* 588, 3998–4007.
- Soh, J., Toyooka, S., Ichihara, S., Suehisa, H., Kobayashi, N., Ito, S., Yamane, M., Aoe, M., Sano, Y., Kiura, K., et al. (2007). EGFR mutation status in pleural fluid predicts tumor responsiveness and resistance to gefitinib. *Lung Cancer Amst. Neth.* 56, 445–448.
- Sohn, B.H., Shim, J.-J., Kim, S.-B., Jang, K.Y., Kim, S.M., Kim, J.H., Hwang, J.E., Jang, H.-J., Lee, H.-S., Kim, S.-C., et al. (2016). Inactivation of Hippo Pathway Is Significantly Associated with Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 22, 1256–1264.
- Solic, N., and Davies, D.E. (1997). Differential effects of EGF and amphiregulin on adhesion molecule expression and migration of colon carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 234, 465–476.
- Song, M.S., Song, S.J., Ayad, N.G., Chang, J.S., Lee, J.H., Hong, H.K., Lee, H., Choi, N., Kim, J., Kim, H., et al. (2004). The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 129–137.
- Song, M.S., Song, S.J., Kim, S.Y., Oh, H.J., and Lim, D.S. (2008). The tumour suppressor RASSF1A promotes MDM2 self-ubiquitination by disrupting the MDM2-DAXX-HAUSP complex. *EMBO J.* 27, 1863–1874.
- Song, S.J., Song, M.S., Kim, S.J., Kim, S.Y., Kwon, S.H., Kim, J.G., Calvisi, D.F., Kang, D., and Lim, D.-S. (2009). Aurora A Regulates Prometaphase Progression by Inhibiting the Ability of RASSF1A to Suppress APC-Cdc20 Activity. *Cancer Res.* 69, 2314–2323.
- Sorrentino, G., Ruggeri, N., Specchia, V., Cordenonsi, M., Mano, M., Dupont, S., Manfrin, A., Ingallina, E., Sommaggio, R., Piazza, S., et al. (2014). Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nat. Cell Biol.* 16, 357–366.
- Stamenkovic, I., and Yu, Q. (2010). Merlin, a “Magic” Linker Between the Extracellular Cues and Intracellular Signaling Pathways that Regulate Cell Motility, Proliferation, and Survival. *Curr. Protein Pept. Sci.* 11, 471–484.
- Stegert, M.R., Tamaskovic, R., Bichsel, S.J., Hergovich, A., and Hemmings, B.A. (2004). Regulation of NDR2 Protein Kinase by Multi-site Phosphorylation and the S100B Calcium-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 279, 23806–23812.
- Sternlicht, M.D., Sunnarborg, S.W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D.C., and Werb, Z. (2005). Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin. *Dev. Camb. Engl.* 132, 3923.
- Stoll, S.W., Johnson, J.L., Li, Y., Rittié, L., and Elder, J.T. (2010). AMPHIREGULIN CARBOXY-TERMINAL DOMAIN IS REQUIRED FOR AUTOCRINE KERATINOCYTE GROWTH. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2031–2040.
- Strizzi, L., Catalano, A., Vianale, G., Orecchia, S., Casalini, A., Tassi, G., Puntoni, R., Mutti, L., and Procopio, A. (2001). Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J. Pathol.* 193, 468–475.
- Sugahara, K.N., Hirata, T., Hayasaka, H., Stern, R., Murai, T., and Miyasaka, M. (2006). Tumor Cells Enhance Their Own CD44 Cleavage and Motility by Generating Hyaluronan Fragments. *J. Biol. Chem.* 281, 5861–5868.

- Sumpter, R., and Levine, B. (2010). Autophagy and Innate Immunity: Triggering, Targeting and Tuning. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 699–711.
- Taira, N., Yamaguchi, T., Kimura, J., Lu, Z.-G., Fukuda, S., Higashiyama, S., Ono, M., and Yoshida, K. (2014). Induction of amphiregulin by p53 promotes apoptosis via control of microRNA biogenesis in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 717–722.
- Tallet, A., Nault, J.-C., Renier, A., Hysi, I., Galateau-Sallé, F., Cazes, A., Copin, M.-C., Hofman, P., Andujar, P., Le Pimpec-Barthes, F., et al. (2014). Overexpression and promoter mutation of the *TERT* gene in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene* *33*, 3748–3752.
- Tanaka, I., Osada, H., Fujii, M., Fukatsu, A., Hida, T., Horio, Y., Kondo, Y., Sato, A., Hasegawa, Y., Tsujimura, T., et al. (2015). LIM-domain protein AJUBA suppresses malignant mesothelioma cell proliferation via Hippo signaling cascade. *Oncogene* *34*, 73–83.
- Tanaka, K., Osada, H., Murakami-Tonami, Y., Horio, Y., Hida, T., and Sekido, Y. (2017). Statin suppresses Hippo pathway-inactivated malignant mesothelioma cells and blocks the YAP/CD44 growth stimulatory axis. *Cancer Lett.* *385*, 215–224.
- Tang, Y., Rowe, R.G., Botvinick, E.L., Kurup, A., Putnam, A.J., Seiki, M., Weaver, V.M., Keller, E.T., Goldstein, S., Dai, J., et al. (2013). MT1-MMP-Dependent Control of Skeletal Stem Cell Commitment via a β 1-Integrin/YAP/TAZ Signaling Axis. *Dev. Cell* *25*, 402–416.
- Taniguchi, K., Wu, L.-W., Grivennikov, S.I., de Jong, P.R., Lian, I., Yu, F.-X., Wang, K., Ho, S.B., Boland, B.S., Chang, J.T., et al. (2015). A gp130-Src-YAP Module Links Inflammation to Epithelial Regeneration. *Nature* *519*, 57–62.
- Testa, J.R., Cheung, M., Pei, J., Below, J.E., Tan, Y., Sementino, E., Cox, N.J., Dogan, A.U., Pass, H.I., Trusa, S., et al. (2011). Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat. Genet.* *43*, 1022–1025.
- Thanh, T., Tho, N., Lam, N., Dung, N., Tabata, C., and Nakano, Y. (2016). Simian virus 40 may be associated with developing malignant pleural mesothelioma. *Oncol. Lett.*
- Thompson, B.J., and Sahai, E. (2015). MST kinases in development and disease. *J Cell Biol* *210*, 871–882.
- Thurneysen, C., Opitz, I., Kurtz, S., Weder, W., Stahel, R.A., and Felley-Bosco, E. (2009). Functional inactivation of NF2/merlin in human mesothelioma. *Lung Cancer* *64*, 140–147.
- Tomlinson, V., Gudmundsdottir, K., Luong, P., Leung, K.-Y., Knebel, A., and Basu, S. (2010). JNK phosphorylates Yes-associated protein (YAP) to regulate apoptosis. *Cell Death Dis.* *1*, e29.
- Toole, B.P. (2009). Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 7462–7468.
- Toyooka, S., Carbone, M., Toyooka, K.O., Bocchetta, M., Shivapurkar, N., Minna, J.D., and Gazdar, A.F. (2002). Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene* *21*, 4340–4344.
- Tranchant, R., Quétel, L., Tallet, A., Meiller, C., Renier, A., Koning, L. de, Reynies, A. de, Pimpec-Barthes, F.L., Zucman-Rossi, J., Jaurand, M.-C., et al. (2017). Co-occurring Mutations of Tumor Suppressor Genes, *LATS2* and *NF2*, in Malignant Pleural Mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* *23*, 3191–3202.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Nicholson, A.G., Yatabe, Y., Austin, J.H.M., Beasley, M.B., Chirieac, L.R., Dacic, S., Duhig, E., Flieder, D.B., et al. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors. *J. Thorac. Oncol.* *10*, 1243–1260.
- Turner, J.-E., Morrison, P.J., Wilhelm, C., Wilson, M., Ahlfors, H., Renauld, J.-C., Panzer, U., Helmbj, H., and Stockinger, B. (2013). IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J. Exp. Med.* *210*, 2951–2965.
- Varelas, X., Samavarchi-Tehrani, P., Narimatsu, M., Weiss, A., Cockburn, K., Larsen, B.G., Rossant, J., and Wrana, J.L. (2010). The Crumbs Complex Couples Cell Density Sensing to Hippo-Dependent Control of the TGF- β -SMAD Pathway. *Dev. Cell* *19*, 831–844.
- Vavvas, D., Li, X., Avruch, J., and Zhang, X.-F. (1998). Identification of Nore1 as a Potential Ras Effector. *J. Biol. Chem.* *273*, 5439–5442.

- Vichalkovski, A., Gresko, E., Cornils, H., Hergovich, A., Schmitz, D., and Hemmings, B.A. (2008). NDR kinase is activated by RASSF1A/MST1 in response to Fas receptor stimulation and promotes apoptosis. *Curr. Biol. CB* *18*, 1889–1895.
- Visser, S., and Yang, X. (2010). LATS tumor suppressor: a new governor of cellular homeostasis. *Cell Cycle Georget. Tex* *9*, 3892–3903.
- Vlahov, N., Scrace, S., Soto, M.S., Grawenda, A.M., Bradley, L., Pankova, D., Papaspyropoulos, A., Yee, K.S., Buffa, F., Goding, C.R., et al. (2015). Alternate RASSF1 Transcripts Control SRC Activity, E-Cadherin Contacts, and YAP-Mediated Invasion. *Curr. Biol.* *25*, 3019–3034.
- Vogelzang, N.J., Rusthoven, J.J., Symanowski, J., Denham, C., Kaukel, E., Ruffie, P., Gatzemeier, U., Boyer, M., Emri, S., Manegold, C., et al. (2003). Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *21*, 2636–2644.
- Vos, M.D., Martinez, A., Elam, C., Dallol, A., Taylor, B.J., Latif, F., and Clark, G.J. (2004). A Role for the RASSF1A Tumor Suppressor in the Regulation of Tubulin Polymerization and Genomic Stability. *Cancer Res.* *64*, 4244–4250.
- Vos, M.D., Dallol, A., Eckfeld, K., Allen, N.P.C., Donniger, H., Hesson, L.B., Calvisi, D., Latif, F., and Clark, G.J. (2006). The RASSF1A Tumor Suppressor Activates Bax via MOAP-1. *J. Biol. Chem.* *281*, 4557–4563.
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* *138*, 3907–3914.
- Walker, A.M., Maxim, L.D., and Utell, M.J. (2012). Are airborne refractory ceramic fibers similar to asbestos in their carcinogenicity? *Inhal. Toxicol.* *24*, 416–424.
- Wang, B., Yong, H., Zhu, H., Ni, D., Tang, S., Zhang, S., Wang, W., Zhou, Y., Zhao, W., Ding, G., et al. (2016a). Abnormal amphiregulin expression correlates with gastric cancer prognosis. *Oncotarget* *7*, 76684–76692.
- Wang, C., Zhu, X., Feng, W., Yu, Y., Jeong, K., Guo, W., Lu, Y., and Mills, G.B. (2016b). Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am. J. Cancer Res.* *6*, 27.
- Wang, H., Du, Y.-C., Zhou, X., Liu, H., and Tang, S.-C. (2014). The dual functions of YAP-1 to promote and inhibit cell growth in human malignancy. *Cancer Metastasis Rev.* *33*, 173–181.
- Wang, J., Sinnott-Smith, J., Stevens, J.V., Young, S.H., and Rozengurt, E. (2016c). Biphasic Regulation of Yes-associated Protein (YAP) Cellular Localization, Phosphorylation, and Activity by G Protein-coupled Receptor Agonists in Intestinal Epithelial Cells A NOVEL ROLE FOR PROTEIN KINASE D (PKD). *J. Biol. Chem.* *291*, 17988–18005.
- Wang, P., Bai, Y., Song, B., Wang, Y., Liu, D., Lai, Y., Bi, X., and Yuan, Z. (2011). PP1A-Mediated Dephosphorylation Positively Regulates YAP2 Activity. *PLOS ONE* *6*, e24288.
- Wang, S., Zhang, Y., Wang, Y., Ye, P., Li, J., Li, H., Ding, Q., and Xia, J. (2016d). Amphiregulin Confers Regulatory T Cell Suppressive Function and Tumor Invasion via the EGFR/GSK-3 β /Foxp3 Axis. *J. Biol. Chem.* *291*, 21085–21095.
- Wang, S., Ma, K., Wang, Q., Sun, F., Shi, Y., Zhan, C., and Jiang, W. (2017). The revised staging system for malignant pleural mesothelioma based on surveillance, epidemiology, and end results database. *Int. J. Surg.* *48*, 92–98.
- Wang, W., Huang, J., Wang, X., Yuan, J., Li, X., Feng, L., Park, J.-I., and Chen, J. (2012). PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. *Genes Dev.* *26*, 1959–1971.
- Wang, W., Xiao, Z.-D., Li, X., Aziz, K.E., Gan, B., Johnson, R.L., and Chen, J. (2015). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat. Cell Biol.* *17*, 490–499.
- Wen, W., Zhu, F., Zhang, J., Keum, Y.-S., Zykova, T., Yao, K., Peng, C., Zheng, D., Cho, Y.-Y., Ma, W., et al. (2010). MST1 Promotes Apoptosis through Phosphorylation of Histone H2AX. *J. Biol. Chem.* *285*, 39108–39116.
- Whang, Y.M., Kim, Y.H., Kim, J.S., and Yoo, Y.D. (2005). RASSF1A Suppresses the c-Jun-NH2-Kinase Pathway and Inhibits Cell Cycle Progression. *Cancer Res.* *65*, 3682–3690.

- Wierzbicki, P., and Rybarczyk, A. (2015). The Hippo pathway in colorectal cancer. *Folia Histochem. Cytobiol. Pol. Acad. Sci. Pol. Histochem. Cytochem. Soc.* 53.
- Wilkinson, D.S., and Hansen, M. (2015). LC3 is a novel substrate for the mammalian Hippo kinases, STK3/STK4. *Autophagy* 11, 856–857.
- Wilkinson, D.S., Jariwala, J.S., Anderson, E., Mitra, K., Meisenhelder, J., Chang, J.T., Ideker, T., Hunter, T., Nizet, V., Dillin, A., et al. (2015). Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy. *Mol. Cell* 57, 55–68.
- Williams, K., Motiani, K., Giridhar, P.V., and Kasper, S. (2013). CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp. Biol. Med.* 238, 324–338.
- Willmarth, N.E., and Ethier, S.P. (2006). Autocrine and Juxtacrine Effects of Amphiregulin on the Proliferative, Invasive, and Migratory Properties of Normal and Neoplastic Human Mammary Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* 281, 37728–37737.
- Wilson, K.E., Li, Y.-W., Yang, N., Shen, H., Orillion, A.R., and Zhang, J. (2014). PTPN14 Forms a Complex with Kibra and LATS1 Proteins and Negatively Regulates the YAP Oncogenic Function. *J. Biol. Chem.* 289, 23693–23700.
- Wilson, K.E., Yang, N., Mussell, A.L., and Zhang, J. (2016). The Regulatory Role of KIBRA and PTPN14 in Hippo Signaling and Beyond. *Genes* 7.
- Woodard, G.A., Yang, Y.-L., You, L., and Jablons, D.M. (2017). Drug development against the hippo pathway in mesothelioma. *Transl. Lung Cancer Res.* 6, 335–342.
- Wu, J., Yin, L., Jiang, N., Guo, W.-J., Gu, J.-J., Chen, M., Xia, Y.-Y., Wu, J.-Z., Chen, D., Wu, J.-F., et al. (2015a). MiR-145, a microRNA targeting ADAM17, inhibits the invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 338.
- Wu, Y., Li, Z., Zhang, C., Yu, K., Teng, Z., Zheng, G., Wang, S., Liu, Y., Cui, L., and Yu, X. (2015b). CD44 family proteins in gastric cancer: a meta-analysis and narrative review. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 3595–3606.
- Xiao, L., Chen, Y., Ji, M., and Dong, J. (2011). KIBRA Regulates Hippo Signaling Activity via Interactions with Large Tumor Suppressor Kinases. *J. Biol. Chem.* 286, 7788–7796.
- Xie, R., Nguyen, S., McKeehan, W.L., and Liu, L. (2010). Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes. *BMC Cell Biol.* 11, 89.
- Xu, C.M., Liu, W.W., Liu, C.J., Wen, C., Lu, H.F., and Wan, F.S. (2013). Mst1 overexpression inhibited the growth of human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther.* 20, 453–460.
- Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., Liu, Y., Wu, H., Liu, Q., Wu, G.S., and Wu, K. (2016). Enrichment of CD44 in basal-type breast cancer correlates with EMT, cancer stem cell gene profile, and prognosis. *OncoTargets Ther.* 9, 431–444.
- Xu, Y., Stamenkovic, I., and Yu, Q. (2010). CD44 attenuates activation of the Hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer Res.* 70, 2455–2464.
- Yamada, M., Ichikawa, Y., Yamagishi, S., Momiyama, N., Ota, M., Fujii, S., Tanaka, K., Togo, S., Ohki, S., and Shimada, H. (2008). Amphiregulin Is a Promising Prognostic Marker for Liver Metastases of Colorectal Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 2351–2356.
- Yang, C.-C., Graves, H.K., Moya, I.M., Tao, C., Hamaratoglu, F., Gladden, A.B., and Halder, G. (2015a). Differential regulation of the Hippo pathway by adherens junctions and apical–basal cell polarity modules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 1785–1790.
- Yang, N., Morrison, C.D., Liu, P., Miecznikowski, J., Bshara, W., Han, S., Zhu, Q., Omilian, A.R., Li, X., and Zhang, J. (2012). TAZ induces growth factor-independent proliferation through activation of EGFR ligand amphiregulin. *Cell Cycle* 11, 2922–2930.
- Yang, S., Zhang, L., Liu, M., Chong, R., Ding, S.-J., Chen, Y., and Dong, J. (2013). CDK1 Phosphorylation of YAP Promotes Mitotic Defects and Cell Motility and Is Essential for Neoplastic Transformation. *Cancer Res.* 73.
- Yang, S., Zhang, L., Purohit, V., Shukla, S.K., Chen, X., Yu, F., Fu, K., Chen, Y., Solheim, J., Singh, P.K., et al. (2015b). Active YAP promotes pancreatic cancer cell motility, invasion and tumorigenesis in a mitotic phosphorylation-dependent manner through LPAR3. *Oncotarget* 6, 36019–36031.

- Yang, S., Zhang, L., Chen, X., Chen, Y., and Dong, J. (2015c). Oncoprotein YAP Regulates the Spindle Checkpoint Activation in a Mitotic Phosphorylation-dependent Manner through Up-regulation of BubR1. *J. Biol. Chem.* *290*, 6191–6202.
- Yin, F., Yu, J., Zheng, Y., Chen, Q., Zhang, N., and Pan, D. (2013). Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell* *154*.
- Yonesaka, K., Zejnullahu, K., Lindeman, N., Homes, A.J., Jackman, D.M., Zhao, F., Rogers, A.M., Johnson, B.E., and Jänne, P.A. (2008). Autocrine Production of Amphiregulin Predicts Sensitivity to Both Gefitinib and Cetuximab in EGFR Wild-type Cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *14*, 6963–6973.
- You, B., Blandin, S., Gérinière, L., Lasset, C., and Souquet, P.-J. (2007). Family mesotheliomas: genetic interaction with environmental carcinogenic exposure? *Bull. Cancer (Paris)* *94*, 705–710.
- Yu, F.-X., and Guan, K.-L. (2013). The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev.* *27*, 355–371.
- Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999). Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* *13*, 35–48.
- Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., et al. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein coupled receptor signaling. *Cell* *150*, 780–791.
- Yu, F.-X., Zhang, Y., Park, H.W., Jewell, J.L., Chen, Q., Deng, Y., Pan, D., Taylor, S.S., Lai, Z.-C., and Guan, K.-L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev.* *27*, 1223–1232.
- Yu, J., Zheng, Y., Dong, J., Klusza, S., Deng, W.-M., and Pan, D. (2010). Kibra functions as a tumor suppressor protein that regulates Hippo signaling in conjunction with Merlin and Expanded. *Dev. Cell* *18*, 288–299.
- Yu, J., Zhai, X., Li, X., Zhong, C., Guo, C., Yang, F., Yuan, Y., and Zheng, S. (2017). Identification of MST1 as a potential early detection biomarker for colorectal cancer through a proteomic approach. *Sci. Rep.* *7*.
- Yuan, F., Xie, Q., Wu, J., Bai, Y., Mao, B., Dong, Y., Bi, W., Ji, G., Tao, W., Wang, Y., et al. (2011). MST1 Promotes Apoptosis through Regulating Sirt1-dependent p53 Deacetylation. *J. Biol. Chem.* *286*, 6940–6945.
- Yuan, M., Tomlinson, V., Lara, R., Holliday, D., Chelala, C., Harada, T., Gangeswaran, R., Manson-Bishop, C., Smith, P., Danovi, S.A., et al. (2008). Yes-associated protein (YAP) functions as a tumor suppressor in breast. *Cell Death Differ.* *15*, 1752.
- Yuan, Z., Lehtinen, M.K., Merlo, P., Villén, J., Gygi, S., and Bonni, A. (2009). Regulation of Neuronal Cell Death by MST1-FOXO1 Signaling. *J. Biol. Chem.* *284*, 11285–11292.
- Zaiss, D.M.W., van Loosdregt, J., Gorlani, A., Bekker, C.P.J., Gröne, A., Sibia, M., van Bergen en Henegouwen, P.M.P., Roovers, R.C., Coffey, P.J., and Sijts, A.J.A.M. (2013). Amphiregulin enhances regulatory T cell suppressive function via the epidermal growth factor receptor. *Immunity* *38*, 275–284.
- Zaiss, D.M.W., Gause, W.C., Osborne, L.C., and Artis, D. (2015). Emerging Functions of Amphiregulin in Orchestrating Immunity, Inflammation, and Tissue Repair. *Immunity* *42*, 216–226.
- Zalcman, G., Mazieres, J., Margery, J., Greillier, L., Audigier-Valette, C., Moro-Sibilot, D., Molinier, O., Corre, R., Monnet, I., Gounant, V., et al. (2016). Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* *387*, 1405–1414.
- Zanconato, F., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* *29*, 783–803.
- Zhang, H., Liu, C.-Y., Zha, Z.-Y., Zhao, B., Yao, J., Zhao, S., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., and Guan, K.-L. (2009a). TEAD Transcription Factors Mediate the Function of TAZ in Cell Growth and Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Biol. Chem.* *284*, 13355–13362.
- Zhang, J., Ji, J.-Y., Yu, M., Overholtzer, M., Smolen, G.A., Wang, R., Brugge, J.S., Dyson, N.J., and Haber, D.A. (2009b). YAP-dependent induction of amphiregulin identifies a non-cell-autonomous component of the Hippo pathway. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1444.
- Zhang, L., Tang, F., Terracciano, L., Hynx, D., Kohler, R., Bichet, S., Hess, D., Cron, P., Hemmings, B.A., Hergovich, A., et al. (2015). NDR functions as a physiological YAP1 kinase in the intestinal epithelium. *Curr. Biol. CB* *25*, 296–305.

- Zhang, P., Wang, S., Wang, S., Qiao, J., Zhang, L., Zhang, Z., and Chen, Z. (2016). Dual function of partitioning-defective 3 in the regulation of YAP phosphorylation and activation. *Cell Discov.* 2, 16021.
- Zhang, W., Zhao, J., Lee, J.-F., Gartung, A., Jawadi, H., Lambiv, W.L., Honn, K.V., and Lee, M.-J. (2013). ETS-1-mediated Transcriptional Up-regulation of CD44 Is Required for Sphingosine-1-phosphate Receptor Subtype 3-stimulated Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 288, 32126–32137.
- Zhang, W.-Q., Dai, Y.-Y., Hsu, P.-C., Wang, H., Cheng, L., Yang, Y.-L., Wang, Y.-C., Xu, Z.-D., Liu, S., Chan, G., et al. (2017). Targeting YAP in malignant pleural mesothelioma. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 2663–2676.
- Zhang, Y., McCluskey, K., Fujii, K., and Wahl, L.M. (1998). Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and -independent mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 161, 3071–3076.
- Zhao, J., and Guan, J.-L. (2009). Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 28, 35–49.
- Zhao, Y., and Yang, X. (2015). Regulation of sensitivity of tumor cells to antitubulin drugs by Cdk1-TAZ signalling. *Oncotarget* 6, 21906–21917.
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* 21, 2747–2761.
- Zhao, B., Li, L., and Guan, K.-L. (2010). Hippo signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 123, 4001–4006.
- Zhao, B., Tumaneng, K., and Guan, K.-L. (2011). The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 13, 877.
- Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.-Y., Yu, J., and Guan, K.-L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* 26, 54–68.
- Zhao, Y., Khanal, P., Savage, P., She, Y.-M., Cyr, T.D., and Yang, X. (2014). YAP-Induced Resistance of Cancer Cells to Antitubulin Drugs Is Modulated by a Hippo-Independent Pathway. *Cancer Res.* 74, 4493–4503.
- Zhu, C., Li, L., and Zhao, B. (2015a). The regulation and function of YAP transcription co-activator. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 47, 16–28.
- Zhu, H., Cheng, X., Niu, X., Zhang, Y., Guan, J., Liu, X., Tao, S., Wang, Y., and Zhang, C. (2015b). Proton-sensing GPCR-YAP Signalling Promotes Cell Proliferation and Survival. *Int. J. Biol. Sci.* 11, 1181–1189.
- Zygulska, A.L., Krzemieniecki, K., and Pierzchalski, P. (2017). Hippo pathway - brief overview of its relevance in cancer. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 68, 311–335.

Annexe : CPP – Essai de phase II/III MAPS

COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES NORD OUEST III CHU – Niveau 03 - Porte 03-508 - Avenue de la Côte de Nacre 14033 Caen Cedex 05

Président : Pr Claude BAZIN
Vice-Président : M. Dominique BEYNIER
Trésorier : Mme Charlotte GOURIO

Lundi, jeudi et vendredi
8 h 30 – 12 h 30
Mardi 8 h 30 – 15 h 15
Fermé le mercredi

Tél : 02.31.47.57.81.
Ou 09.64.08.19.44.
Fax : 02.31.06.48.73.
E-mail : cppnordouest3@orange.fr

Unité de Biostatistique et Recherche Clinique
à l'attention de M. CHAILLOT •
CHU CAEN
niveau 03

Ref. CPP : 2007-20
Ref. CHU : 07-059
N° ID RCB : 2007-A00442-51

Extrait des délibérations du 7 juillet 2007 du Comité de Protection des Personnes Nord-Ouest III, dont la séance non publique s'est tenue au CHU de Caen à cette date à partir de 9 h 00, sur la convocation de ses membres par son Président.

Siégeaient ensemble ce 7 juillet 2007, sous la présidence de M. le Professeur Claude BAZIN,

Membres du premier collège

au titre du 1° de l'article R.1123-4 du CSP

- * M. Claude BAZIN, Président du Comité, médecin, membre titulaire,
- * M. Guy LALINOY, personne qualifiée en raison de sa compétence en matière de biostatistique ou d'épidémiologie, membre titulaire,
- * M. Jean-Marie REIMUND, médecin, membre suppléant,

au titre 2° de l'article R.1123-4 du CSP

- * M. Bertrand VIENNOT, médecin généraliste, membre titulaire,

au titre 3° de l'article R.1123-4 du CSP

- * Mme Charlotte GOURIO, pharmacien hospitalier, membre titulaire,

au titre 4° de l'article R.1123-4 du CSP

- * Mme Jacqueline BOUCHET, cadre de santé, membre titulaire,

Membres du second collège

au titre 2° de l'article R.1123-4 du CSP

- * M. Didier DRIEU, psychologue, membre suppléant,

au titre 3° de l'article R.1123-4 du CSP

- * M. Michel CHARRIER, travailleur social, membre titulaire,

au titre 4° de l'article R.1123-4 du CSP

- * Maître Jérôme VOGT, personne qualifiée en raison de sa compétence en matière juridique, membre titulaire,

au titre 5° de l'article R.1123-4 du CSP

- * Mme Geneviève LEBLACHER, représentante d'association agréée de malades ou d'usagers du système de santé, membre titulaire,
- * M. Xavier VIOLLET, représentant d'association agréée de malades ou d'usagers du système de santé, membre titulaire,

Membre convoqué en qualité d'expert

au titre de l'article R.1123-13 du CSP

- * M. Antoine COQUEREL, médecin, expert en pharmacologie, qualifié en pédiatrie, membre suppléant,
- * M. Benoît DUPUY, médecin expert en neurologie, membre suppléant,

Après avoir constaté que les conditions de l'article R.1123-11 du CSP étaient réunies, le Président du Comité, qui avait fixé l'ordre du jour de la séance, a ouvert celle-ci.

Exposé

Le Comité de Protection des Personnes Nord Ouest III s'est réuni le samedi 7 juillet 2007 pour prendre connaissance des réponses apportées par M. le Professeur ZALCMAN, investigateur coordonnateur, à la demande d'information formulée lors de la séance du 9 juin 2007 concernant un projet de recherche intitulé : «Essai randomisé de phase II-III testant l'association Pemetrexed-Cisplatine avec ou sans bevacizumab à 15 mg/kg, dans le mésothéliome malin de la plèvre (MPM)», l'investigateur coordonnateur étant M. le Professeur ZALCMAN exerçant au CHU de Caen (Service de Pneumologie).

Sur la désignation du Président, M. Claude BAZIN (collège 1), M. le Professeur COQUEREL (expert en pharmacie et collège 1) et M. DRIEU (collège 2), ont successivement fait leur rapport aux membres présents du Comité.

Sur quoi, après discussion, les membres présents, qui ont déclaré n'avoir aucun lien direct ou indirect, avec le promoteur ou l'investigateur coordonnateur au sens de l'article L.1123-3, ont participé, à la délibération sur la demande d'avis, et ont arrêté, au moins à la majorité simple des membres présents, la délibération motivée suivante :

Délibération

Considérant les documents suivants :

- * courrier de demande d'autorisation d'essai clinique daté du 14 mai 2007, signé du promoteur,
- * formulaire de demande d'autorisation d'une recherche biomédicale portant sur un médicament à usage humain daté du 14 mai 2007, signé du promoteur
- * document additionnel du 25 avril 2007
- * attestation d'assurance (SHAM arithésion n° 127 RT9) datée du 5 juin 2007.
- * récépissé de justification de paiement de la taxe recherches et collections biologiques en date du 29 mai 2007,
- * formulaire de déclaration d'une collection d'échantillons biologiques humains daté du 11.05.2007, signé du Pr ZALCMAN, investigateur coordonnateur
- * liste des centres investigateurs
- * CV des investigateurs principaux, datés, signés: Dr C. CHOUAID, Dr L. MONNET, Dr P. JACOULET, Dr D. BRAUN ; Dr D. DEBIEUVRE, Dr JL. BRETON ; Pr E. QUOIX, Dr J. MAZIERES, Dr FX LEBAS, Dr J. BENNOUNA, Dr B. MILLERON ; Pr G. ZALCMAN, Dr A. SCHERPEREEL, Pr A. VERGNEGRE, Dr C. LOCHER, Dr M. GRIVAUX, Pr Y. MARTINET, Dr O. MENARD, Dr P. FOURNEL, Dr G. ROBINET, Pr L. THIBERVILLE, Dr S. BOYTA, Dr JM. BRECHOT, Dr C. DANIEL, Dr E. MAGEOIS, Pr P. ASTOUL, Dr F. BARLES, Dr C. AUDIGIER-VALETTE, Dr P.J. SOUQUET, Dr P.J. SOUQUET, Dr L. GERINIERE, Dr F. CHOMY, Dr H. LENA, Dr M. PEROL, Dr D. ARPIN,
- * Brochure de l'investigateur, laboratoire ROCHE
- * résumé du protocole version 1 du 25 avril 2007,
- * protocole version 1 du 25 avril 2007,
- * document d'information, version 1 du 25 avril 2007,
- * Courrier relatif aux réponses aux différentes précisions demandées par le Comité de Protection des Personnes Nord Ouest III le 9 juin 2007, daté du 27 juin 2007
- * Protocole version 2 du 9 juin 2007
- * Lettre d'information essai thérapeutique version 2 du 9 juin 2007 annexe 6
- * Formulaire de consentement éclairé du 9 juin 2007
- * Lettre d'information au patient du 9 juin 2007 étude clinique
- * Formulaire de consentement à l'étude biologique bio-MAPS du 9 juin 2007

Vu l'article R.1123-25 du CSP,

le comité émet un AVIS FAVORABLE A LA RECHERCHE A LA CONDITION

1. que le promoteur, CHU de Caen, exprime par écrit la manière dont il fera articuler les rôles respectifs du médecin de la société prestataire de service en pharmacovigilance, l'Intergroupe Francophone de Cancérologie Théorique (IFCT), et le personnel de pharmacovigilance du promoteur,
2. que soit précisé, outre la nature et les modalités de la sous-traitance, le mode de transmission des données des investigateurs vers leurs CRPV respectifs pour les événements indésirables

non liés au médicament en essai et les moyens employés par l'IFGT pour faire des tableaux synthétiques et exhaustifs des données de tolérance.

3. que l'ensemble de ces recueils, transmissions et réévaluations concertées, soit audité d'ici le 100^{ème} patient.
4. que la vérification de la conformité des procédures relève du CHU, promoteur, au besoin secondé par l'AFSSAPS ou ses représentants.

Ainsi délibéré à Caen, le 7 juillet 2007.

Pour extrait conforme au registre,
Le Président



Professeur Claude Bazin

Expériences professionnelles

Recherche:

- Octobre 2014: **Doctorat** dans l'unité **INSERM 1086 Cancer et Prévention** en collaboration avec le laboratoire **Œstrogène Reproduction Cancer (OeReCa)**, EA 2608, Université de Caen Basse-Normandie (Structure d'accueil) les 27 premier mois et au sein de l'unité **ISTCT FRE2001** - CNRS-CEA-Normandie Université- Equipe Cervoxy les 8 derniers mois de thèse.
Sujet : Place de la signalisation Hippo dans l'histoire naturelle du Mésothéliome Pleural Malin (MPM).
Financement : 50% région Basse-Normandie - 50% association des insuffisants respiratoires (AIR), contrat INSERM (octobre 2014 - décembre 2017).
Directeurs de thèse : Dr Guénaëlle Levallet (Directeur principal) et Pr Gérard Zalcmann (Co-Directeur)
- Nov/Juin 2014: **Stage de Master 2 recherche** (8 mois) dans l'unité **INSERM 1086 Cancer et Prévention** en collaboration avec le laboratoire **Œstrogène Reproduction Cancer (OeReCa)**, EA2608, Université Caen Basse-Normandie (structure d'accueil).
Sujet : Etude de la place de la signalisation NF2/RASSF1A/Hippo dans l'agressivité de cellules de lignées mésothéliales pleurales malignes humaines.
Encadrants : Pr Gérard Zalcmann et Dr Guénaëlle Levallet
- Avril/Juin 2013: **Master 1 recherche** (3 mois), idem Master 2.
Sujet : Etude du rôle de RASSF1A dans la mort programmée des cellules de la lignée épithéliale bronchique humaine (HBEC-3) immortalisée.
Encadrants : Pr Gérard Zalcmann et Dr Guénaëlle Levallet
- Avril/Juin 2011: **Stage de DUT** (10 semaines) au laboratoire OeReCa, Université Caen Basse-Normandie.
Sujet : Effet de co-culture de deux types cellulaires (cellules de Sertoli et germinales) sur l'expression de gènes d'intérêts.
Encadrant : Dr Héléne Bouraïma

Enseignement:

- **Biologie animale** niveau Licence 1 (39h TP), **Immunologie** niveau Licence 3 (25h TP et 8h TD), **Informatique**: préparation au C2I niveau Licence 2 (30h).
Institut de Biologie Fondamentale et Appliqué (IBFA), Université de Caen Basse-Normandie.
- **Cancérologie** niveau 3^{ème} année d'infirmière (3h CM)
Instituts de Formation en Soins Infirmiers et d'aide-Soignant (IFSI), Centre Hospitalier de l'Aigle.

Encadrement:

- **Master 2** (Solenn Brosseau) pendant 10 mois (formation aux techniques et exploitation des résultats)
- Plusieurs Licence 3, DUT

Vulgarisation Scientifique:

- Présentation affichée au 19^{ème} Journée de l'école doctorale NBISE
- Intervention dans des collèges/lycées pour la fête de la Science 2014

Diplômes/Cursus universitaire

- Depuis 2014: **Doctorat Aspects Moléculaire Cellulaire Biologique**, Université de Caen Basse-Normandie.
- Juin 2014: **Master recherche Physiologie Immunité Différenciation Génétique**, option Signalisation, Différenciation Cellulaire, mention Bien, Université de Caen Basse-Normandie.
- Juillet 2012: **Licence Biologie physiologie animale**, Université de Caen Basse-Normandie.
- Juin 2011: **DUT Génie Biologique**, option Analyses Biologiques et Biochimiques, Université Caen Basse-Normandie.
- 2008/2009: Préparation PCEM1, Université de Caen Basse-Normandie.
- Juin 2008: **Baccalauréat STL** (Science Techniques de Laboratoire), option Biochimie Génie Biologique, mention Assez Bien. Lycée privé Saint Jean Eudes de Vire.

Publications

Maille E., Brosseau S., Hanoux V., Creveuil C., Danel C., Bergot E., cliniciens du protocole MAPS, Langlais A., Morin F., Levallet G., Zalcman G. By preventing YAP activation, MST1 expression predicts better survival in patients with malignant mesothelioma: Bio-MAPS cohort (Article soumis à Annals of oncology).

Keller M., Dubois F., Hergovich A., **Maille E.**, Camonis J., Levallet G., Zalcman G. Hippo kinases NDR1/2 drive metastasis phenotype of RASSF1A depleted human bronchial epithelial cells (Article en préparation).

Communications scientifiques

Maille E., Brosseau S., Pham A-D., Creveuil C., Danel C., Bergot E., Morin F., Levallet G., Zalcman G. La perte d'expression de la kinase MST1 est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints d'un mésothéliome pleural malin (MPM) : Etude bio-MAPS. Journée normande de recherche biomédicale (JNRb), Caen le 14 novembre 2017.

Maille E., Brosseau S., Pham A-D., Creveuil C., Danel C., Bergot E., Levallet G., Zalcman G. Expression du CD44, de l'amphiréguline et du CD34 chez 448 patients atteints de mésothéliome pleural malin (MPM): Etude bio-MAPS. 9^{ème} Journées du Cancéropole Nord-Ouest, Deauville du 18-20 mai 2016. Obtention d'une **Bourse de voyage**.

Dubois F., Keller M., **Maille E.**, Elie N., Galas L., Bénard M., Zalcman G., Levallet G. Etude de la formation de jonctions communicantes longue distance (nanotubes) entre cellules de lignées épithéliales bronchiques humaines. 21^{ème} Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytologistes, Toulouse 17-20 Mars 2016.

Chevalier E., Brosseau S., Levallet G., Zalcman G. Des taux élevés de CD44 standard et d'amphiréguline reflètent l'agressivité des cellules de lignées de mésothéliome pleural malin. 19^{ème} Journée de l'école doctorale NBISE, Caen les 10 et 11 mars 2016.

Chevalier E., Brosseau S., Levallet G., Zalcman G. Des taux élevés de CD44 standard et d'amphiréguline reflètent l'agressivité des cellules de lignées de mésothéliome pleural malin. 8^{ème} Journées du Cancéropole Nord-Ouest, Deauville du 10-12 juin 2015 (**Bourse de voyage**) et 6^{ème} Journées de la Recherche du CHU de Caen le 2015.

Brosseau S., Pham A-D., **Chevalier E.**, Creveuil C., Morin F., Levallet G., Zalcman G. Les hyperméthylations des promoteurs de RASSF2A et MST1 sont-elles des marqueurs pronostiques du mésothéliome pleural malin? 8^{ème} Journées du Cancéropole Nord-Ouest, Deauville du 10-12 juin 2015.

Brosseau S., **Chevalier E.**, Pham A-D., Creveuil C., Morin F., Levallet G., Zalcman G. La kinase MST1: un biomarqueur pronostique du mésothéliome pleural malin (MPM)? 11^{ème} Journées de recherche respiratoire (J2R), Dijon les 9-10 octobre 2015.

Keller M., Hergovich A., Dubois F., **Chevalier E.**, Zalzman G., Levallet G. Les kinases pro-apoptotiques NDR1/2 sont nécessaires à la motilité des cellules de lignées épithéliales bronchiques humaines dépourvues de RASSF1A. 20^{ème} Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytologistes, Paris du 12-14 mars 2015.

Brosseau S., **Chevalier E.**, Pham A-D., Creveuil C., Morin F., Levallet G., Zalzman G. MST1 et RASSF2A, biomarqueurs pronostiques potentiels du mesothéliome pleural malin (MPM)? 20^{ème} Congrès de pneumologie de langue française (CPLF) – Lille 29-31 janvier 2016.

Chevalier E., Houllier L., Levallet J., Levallet G., Zalzman G. H2052, H2452, H28, MSTO-221H, MET-5A : quel(s) modèle(s) choisir pour mieux comprendre l'histoire naturelle du mésothéliome pleurale malin (MPM)? 7^{ème} Journées du Cancéropole Nord-Ouest, Deauville du 14-16 mai 2014. Obtention d'une **Bourse de voyage**.

Keller M., Levallet G., Dubois F., **Chevalier E.**, Zalzman G. Yap/Taz: Etude du différentiel des effecteurs terminaux de la voie de signalisation Hippo chez l'homme. 7^{ème} Journées du Cancéropole Nord-Ouest, Deauville du 14-16 mai 2014.

Keller M., Levallet G., Dubois F., **Chevalier E.**, Zalzman G. Yap/Taz: the Janus faces of the Hippo mammals cells signaling integration. 17^{ème} Journée de l'école doctorale, Le Havre les 10-11 avril 2014.

Compétences Techniques

Culture cellulaire et bactérienne

Biologie cellulaire : Transfection cellulaire, Test d'invasion, Migration, d'adhésion, d'apoptose, de prolifération, de croissance en agar et culture sphéroïde (nucléosphéra, BD®).

Biologie moléculaire : Immunofluorescence et Microscopie confocale, Immunohistochimie, ELISA, extraction ARN, ADN et protéique, Western-Blot, RT-qPCR.

Formations

- Formation à la **communication scientifique** de relais d'sciences (Atelier du chercheur) avec 2 jours d'intervention lors de la Fête de la Science dans des collèges et lycées, afin de présenter notre sujet de thèse.
- Formations mutualisées de l'école doctorale NBISE, Université de Caen Basse-Normandie.
 - Formation à la **mission d'enseignement**.
 - Initiation au logiciel de gestion des références bibliographiques **Zotero**.
 - Formation **Préparation à la recherche d'emploi** : De la thèse à l'emploi : insertion professionnelle des docteurs.
 - Formation **Carrières et management** : Théorie des organisations
 - Formation avancées **WORD** : Règles et techniques de rédaction, création et structuration de documents scientifiques (thèses, articles, posters).

RESUME : Le mésothéliome pleural malin (MPM) est une tumeur primitive de la plèvre, rare, très agressive, avec un pronostic sombre. Nous avons souhaité au cours de ce travail de thèse, identifier de nouveaux biomarqueurs du MPM en testant l'influence de l'inactivation des membres de la famille RASSF/Hippo sur la survie des 448 patients inclus dans l'essai clinique MAPS (IFCT-GFPC-0701). Nous souhaitons également comprendre quelles fonctions et signalisations essentielles à l'homéostasie cellulaire, auxquelles participe la voie de signalisation RASSF/Hippo, sont perturbées lors du processus de transformation des cellules mésothéliales. L'inactivation des membres de la voie a été étudiée par PCR spécifique de méthylation (MS-PCR) et leur influence sur la survie des 448 patients inclus dans l'essai clinique MAPS testée en analyse uni- et multivariée avant d'être validée par bootstrap. D'autre part, nous avons mimé *in cell*, l'inactivation par ARN interférence de plusieurs membres de la voie Hippo dans des cellules de lignées mésothéliales humaines (MSTO-211H, H2452, H28 et H2052). Nous avons pu identifier plusieurs biomarqueurs du MPM : **i)** la kinase MST1 dont l'inactivation est un facteur de mauvais pronostic, **ii)** l'amphiréguline dont l'expression cytoplasmique est au contraire un facteur de bon pronostic et enfin **iii)** le CD44 dont l'expression élevée constitue un outil diagnostique du MPM. Les approches *in cell*, nous ont permis de démontrer que les altérations de la voie RASSF/Hippo induisent une activité inappropriée de l'effecteur terminal YAP : le moins bon pronostic des patients présentant une inactivation de MST1 s'explique ainsi par le fait qu'en régulant l'activité de YAP, MST1 contrôle la balance apoptose/prolifération et prévient l'invasion et la croissance sans adhésion. En son absence, ces processus cellulaires sont dérégulés. Ce travail démontre l'importance de l'axe CD44/RASSF1A/MST1 dans le contrôle d'une activité appropriée de YAP et de l'homéostasie des cellules mésothéliales. La compréhension des désordres cellulaires induits par la dérégulation de la voie RASSF/Hippo, désigne YAP comme cible thérapeutique potentielle chez les patients atteints de MPM et présentant des altérations de cette voie de signalisation.

Mots clés : Mesothéliome pleural malin, MAPS, MST1, YAP, RASSF, Amphiréguline

ABSTRACT : Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a rare, very aggressive, primary tumor with a poor prognosis. During this thesis, we wanted to identify new biomarkers of MPM by testing the influence of the RASSF/Hippo pathway inactivation on the survival of the 448 patients included in the clinical trial MAPS (IFCT- GFPC-0701). We also wanted to understand which functions and signals essential to cellular homeostasis, linked to RASSF/Hippo signaling pathway, are disturbed during the mesothelial cell transformation process. Inactivation of RASSF/Hippo members was studied by methylation-specific PCR (MS-PCR) and their influence on the survival of the 448 patients included in the MAPS clinical trial tested in uni- and multivariate analysis before being validated by bootstrap. We also mimed *in cell*, by RNA interference, several members of the Hippo pathway inactivation in human mesothelial cells lines (MSTO-211H, H2452, H28 and H2052). We have identified several biomarkers of MPM: **i)** MST1 kinase whose inactivation is a factor of poor prognosis, **ii)** amphiregulin whose cytoplasmic expression is on the contrary a factor of good prognosis and finally **iii)** CD44 whose high expression is a diagnostic tool for MPM. *In cell* we demonstrate that RASSF/Hippo pathway alterations induce an inappropriate activity of YAP, one Hippo end effector: the poorer prognosis of patients with inactivation of MST1 is thus explained by the fact that, by regulating YAP activity, MST1 controls the apoptosis/proliferation balance and prevents invasion and growth without adhesion from mesothelial cells. In its absence, these cellular processes are deregulated. This work finally demonstrates the importance of the CD44/RASSF1A/MST1 axis in controlling appropriate YAP activity and mesothelial cell homeostasis. The understanding of the cellular disorders induced by the of the RASSF/Hippo pathway deregulation designates YAP as a potential therapeutic target in patients with MPM and presenting alterations of this signaling pathway.

Keywords : Malignant pleural mesothelioma, MAPS, MST1, YAP, RASSF, Amphiregulin
