

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE NANTES
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Cancérologie

Par

Sarah Morice

Rôle de la voie de signalisation Hippo dans le développement des ostéosarcomes

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 11/12/2019
Unité de recherche : INSERM UMR1238, Phy.OS

Rapporteurs avant soutenance :

Natacha Entz-Werle Professeur des universités, praticien hospitalier, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg
Daniel Bouvard Directeur de recherche, INSERM – Institut Albert Bonniot

Composition du Jury :

Président : Anne Gomez-Brouchet Professeur des universités, praticien hospitalier, Institut universitaire du cancer

Examineurs :	Françoise Rédini	Directeur de recherche, INSERM UMR 1238, Phy.OS
	Benjamin Ory	Maître de conférence des universités, INSERM UMR 1238, Phy.OS
	Anne Gomez-Brouchet	Professeur des universités, praticien hospitalier, Institut universitaire du cancer
Directeur de thèse :	Franck Verrecchia	Directeur de recherche, INSERM UMR 1238 Phy.OS
Invitée :	Patricia Blanc	Présidente de l'association Imagine for Margo

Remerciements



Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire **des Sarcomes osseux et remodelage des tissus calcifiés, INSERM UMR1238**, dans l'équipe de recherche 1 : Micro-environnement des tumeurs osseuses primitives : signalisation et ciblage thérapeutique. Ce travail a été effectué sous la direction du directeur de recherche **Franck Verrecchia** grâce au soutien financier de l'association **Imagine for Margo**.

Je tiens à remercier particulièrement **Patricia Blanc**, présidente de l'association **Imagine for Margo**, pour avoir financé ces travaux de recherche et nous avoir soutenu dans la réalisation de cette thèse de doctorat. Merci d'agir quotidiennement pour accélérer la recherche contre les cancers pédiatriques.

Je remercie mon directeur de thèse **Franck Verrecchia** de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ces travaux de recherches, pour m'avoir formé, conseillé et soutenu tout au long de ces années. Merci pour ta grande disponibilité, tes précieux conseils scientifiques mais aussi de la confiance que tu m'as accordée en me laissant une grande autonomie au cours de ces années. Merci de m'avoir laissé expérimenter me permettant d'évoluer et de développer un esprit critique.

Je remercie le Docteur **Françoise Rédini** pour son accueil au sein de son laboratoire, pour sa gentillesse et son soutien. Merci d'avoir trouvé le soutien financier m'ayant permis de réaliser ce travail et pour les précieux conseils scientifiques. Merci de toujours garder un lien étroit avec les associations de patients et la recherche clinique, nous rappelant ainsi les raisons de nos recherches qui peuvent parfois être très fondamentales. Merci également de m'avoir toujours aidé lorsque j'avais besoin de conseils sur un article, une présentation, un congrès ou lors de la rédaction de ma thèse.

Merci au Professeur **Natacha Entz-Werle** et au Docteur **Daniel Bouvard** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ces travaux de thèse.

Merci au Professeur **Anne Gomez-Brouchet** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au docteur **Benjamin Ory** pour avoir suivi l'évolution de ces travaux au cours de mes trois années de thèse et de participer à mon jury de thèse.

Merci **Franck**, encore une fois pour avoir tout fait pour que je puisse continuer en thèse. C'est grâce à toi que j'ai pu réaliser tout ce travail qui m'a passionné pendant presque 5 ans. Merci pour tous tes conseils du quotidien, tes remarques toujours pertinentes, les discussions scientifiques passionnantes, merci pour l'écriture de l'article et l'aide à la rédaction de thèse. Merci aussi pour ton aide pour les manips, peu de directeurs de thèse reste présent comme toi à la paillasse, toujours de bonne humeur même quand je perdais un peu ma motivation. Merci également de m'avoir permis de partir de l'autre côté de l'Atlantique pour présenter mes travaux. Merci de m'avoir soutenu, même dans certaines idées farfelues. Je suis (vraiment) très heureuse de poursuivre ce projet pour les six prochains mois, merci beaucoup pour ta confiance sur ce futur travail.

Merci à tous les membres du laboratoire pour toute l'aide au quotidien mais aussi leur gentillesse et leur bonne humeur, ces 5 années auprès de vous vont rester mémorables.

Merci **Sarah (tac)**, on a commencé ensemble dans ce laboratoire en master 1. Merci pour ta gentillesse, ton aide (surtout pour le vivo) ta bonne humeur et ton dynamisme. Tu es pleine de ressources, c'est agréable de travailler ensemble, je suis heureuse d'avoir partagé toutes ces années avec toi.

Merci **Brice**, de la team thésard. Merci d'avoir égayé nos manips avec ta musique (forte), l'acharné du travail et du labo. Merci d'avoir partagé ces années de thèses.

Merci **Geoffroy**. Merci pour ta bonne humeur, tes blagues presque du niveau de Régis. Merci pour toute ton aide dans les manips et les galères. Merci pour toutes tes bonnes idées, dans les manips (*le cache lumière...*) mais aussi dans la vie du labo, les Œufs de pâques et la raclette vont devenir des traditions. Je me souviendrai toujours de notre premier congrès à Sheffield, le plus gros stress de ma thèse, et ses péripéties. On y est arrivé même si on a failli louper l'avion. Merci de m'avoir soutenu dans ce moment particulier et pendant toutes ces années.
+ 100000 points.

Merci **Mathilde**, de la « team Verrecchia ». J'ai commencé avec toi, merci pour tout. Merci pour les manips, pour ton aide, pour le vivo, pour ton écoute, ta bonne humeur. Merci aussi pour ta présence dans les moments moins marrants, de toujours accepter de m'aider pour les souris. Garde ta motivation et surtout, fais-toi confiance, tu es capable.

Merci **Régis**, que dire, pour un Vendéen libanais, t'es plutôt normal finalement. Je vais me répéter mais merci encore pour TOUTE ton aide pendant ces années, depuis le début tu es toujours disponible. À la moindre petite question, on sait vers qui se tourner, tu es toujours là pour tout le monde, même trop parfois. Tu as toujours le bon conseil pour les manips. Merci pour toutes ces heures de culture à rigoler plutôt que manipuler, (tu as contribué à rallonger ma culture du lundi...). Merci aussi pour tout le reste, de me soutenir et me motiver. Merci pour ton humour si ... particulier.... Je ne remercie pas pour les lumières éteintes, les blagues nulles (sur les *dromadaires*, je retiendrai que celle-ci... arrête les documentaires animaliers), la boîte à meuh, la carboglace qui explose, la glace dans la blouse, le comique de répétition et j'en oublie. Merci d'être là au labo mais aussi en dehors. Merci pour ta boum et les kilos en plus. Tes futurs collègues auront bien de la chance, même si tu passes ton temps à râler, tu es ADORABLE ;). Pour toutes nos soirées et nos discussions qui se transforment en débat. Merci pour tout.

Merci **Robel**, le thésard en bioinformatique. Merci (vraiment) beaucoup pour tout le temps que tu as passé sur mon projet. C'était une chance inespérée d'avoir ton aide sur ce travail. Merci pour tes conseils, le temps que tu as passé à m'expliquer des notions de bases en bioinfo. Merci pour ta bonne humeur et ta nonchalance du quotidien, j'ai apprécié travailler avec toi.

Merci **Mélanie**. Merci pour tout. Tu es toujours de bonne humeur et souriante. C'était un plaisir de partager le bureau 146 avec toi... Pour nos longues discussions avec Catherine, nos pauses café... Merci pour le trafic de cellules, pour le partage d'anticorps, les longues heures de culture.... Merci d'être toujours à l'écoute, pour les manips mais surtout pour tout le reste. Merci pour ton couscous, et surtout pour ta capacité à faire de la semoule... ;). Tu te débrouilles mieux pour nous ramener des madeleines bijou :). Tu es une amie en or. Merci.

Merci **Catherine**, avec qui j'ai partagé le bureau 146 pendant trois ans. J'ai adoré toutes nos discussions toujours intéressantes sur l'éthique à la recherche, l'assurance qualité et sur tout

le reste, merci pour ta rigueur et tous tes conseils sur le plan scientifique. Merci aussi pour toutes tes anecdotes sur les jurys de concours.

Merci **Paul**, toujours à l'écoute, toujours de bons conseils. C'est un plaisir de discuter de science avec toi. Tu es toujours partant pour l'apéro (qualité non négligeable), et pour aller voir les illuminations de Noël... Je suis contente de partager ton bureau pour les six prochains mois.

Merci **Julien** pour tes conseils en histo, c'est vraiment une chance pour labo de t'avoir comme technicien. Tu es toujours dispo, toujours serviable et de bonne humeur. Merci.

Merci **Louise**, pleine de dynamisme et de caractère. Tu es impressionnante pour ta capacité à rebondir et relativiser. Tu vas faire une thèse super, tu le mérites.

Merci **Maryne** (avec un Y), pour ta bonne humeur et ton sourire. Et la raclette. Tu prends la relève et tu réussiras sans aucun doute. Merci à **Adèle**, qui est partis au pays des caribous. Merci les filles pour votre soutien même si vous en aviez marre que « tout marche ». Merci de m'avoir accompagné à l'animalerie pour m'aider dans la partie la plus difficile de l'expérimentation animale pour moi, ça m'a beaucoup aidé. Félicitations à vous pour votre thèse et à tous les autres masters 2, **Emilien** qui vient de commencer sur un super projet et **Alexandre** qui a trouvé une super thèse.

Merci **Luciano** pour avoir partagé nos galères de thésard. Merci pour ta bonne humeur.

Merci **Jorge**, c'était un plaisir de travailler avec toi dans l'équipe.

Merci à tous les membres de l'équipe 1 pour vos bons conseils pendant les réunions d'équipe, et tous les jours au labo.

Merci **Isabelle**, pour ta disponibilité, ta gentillesse, et tes super idées. Tu as permis d'améliorer nos résultats sur beaucoup de points.

Merci **Frédéric L.**, pour tes conseils sur la minéralisation et sur le reste.

Merci **Bénédicte** de m'avoir permis de découvrir le monde de l'enseignement en biochimie. C'était une expérience enrichissante qui m'a beaucoup apporté. Merci pour tous les conseils du quotidien.

Merci **Benjamin** d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse. Merci de nous avoir permis d'initier un nouveau projet sur les résistances, c'est une super collaboration j'ai vraiment hâte de continuer. Merci pour tous tes conseils et ton aide précieuse, au labo mais aussi quand il faut déménager deux apparts :).

Merci **François** pour tes conseils scientifiques et pour le reste. Tu es le MacGyver du labo, s'il nous manque un adaptateur ou quoique ce soit, je sais à qui demander.

Merci **Marco** pour ta gentillesse, tes conseils et ta bonne humeur, et la carboglace. Merci de nous avoir fait découvrir Sheffield comme des autochtones.

Merci **Thibaut**, tu es toujours de bon conseil pour les manip, grâce à toi j'ai pu faire minéraliser des cellules tumorales.

Merci **Jérôme** pour tes conseils en histologie, et surtout pour ta capacité à couper au microtome plus vite que n'importe qui.

Merci **Céline** pour ton sourire et ta disponibilité. Tu es toujours présente pour donner un coup de main.

Merci **Séverine** pour tes conseils avisés sur l'expérimentation animale et surtout pour le micro scanner.

Merci **Valérie, Frédéric B.** et **Pierre**, pour vos conseils et surtout vos questions en réunion de laboratoire.

Merci **Marie-Hélène**, pour toutes ces commandes passées en urgence et l'organisation des voyages.

Merci **Sandrine**, tu es toujours disponible quand il s'agit de résoudre un problème. Merci pour ta réactivité.

Merci encore à tous les membres du laboratoire, LPRO puis Phy.OS, et à tous ceux qui sont partis, **Kévin, Benoît, Romain, Marie-Astrid** et les autres.

Merci **Audrey**, la plus scientifique des médecins du labo. Je suis vraiment contente qu'on puisse travailler ensemble les six prochains mois.

Merci à mes amis qui ont suivis l'évolution de mon stress ces six derniers mois, aux gars de l'escalade qui ont subis mes angoisses (désolée **Sébastien** et **Thomas...**).

Merci à ma famille, mes parents. Merci à ma grande sœur **Rachel**, qui ne comprends pas vraiment ce que je fais mais qui me soutiens toujours. Tu es la meilleure artiste que je connaisse (en toute objectivité bien sûr). Merci à mon petit frère **Victor**, et ma petite sœur **Esther**, vous ne comprenez rien du tout à ce que je fais mais vous êtes toujours fiers de dire que vous avez une grande sœur qui « fait de la recherche ». Je vous adore. Merci à toi **Richard**, tu es le meilleur beau-père qu'on puisse espérer avoir. Merci à ma maman, **Christèle**, d'avoir tout fait pour qu'on puisse réussir et avoir la plus belle vie possible. Merci pour tes encouragements et ton soutien sans faille pendant toutes ces années.

Je vous aime fort.

Enfin, merci à toi **Steven**. Je ne saurai jamais comment te remercier assez pour ton soutien inégalable pendant ces années, et je sais que ce n'est pas facile tous les jours. Mais tu as su me donner confiance en moi quand je n'en avais plus, m'encourager, me rassurer, me soutenir... Tu as toujours cru en moi. Tu m'as permis de me dépasser, d'aller au-delà de mes limites, de mes peurs. Je suis une meilleure personne quand je suis avec toi. *Je t'aime.*

TABLE DES MATIÈRES

Introduction	- 1 -
I. Ostéosarcomes	- 1 -
A. Le tissu osseux	- 1 -
1) Les cellules osseuses	- 1 -
2) Le remodelage osseux	- 3 -
B. Epidémiologie	- 5 -
C. Différents types d'ostéosarcomes	- 6 -
D. Étiologie et facteurs de risques	- 8 -
1) Caractéristiques physiologiques	- 9 -
2) Facteurs génétiques et familiaux /anomalies cytogénétiques	- 9 -
3) Facteurs environnementaux	- 10 -
E. Clinique	- 10 -
1) Diagnostic	- 10 -
2) Traitements actuels	- 12 -
3) Traitements en développement	- 15 -
II. Voie de signalisation Hippo	- 18 -
A. Historique	- 18 -
B. Composants de la voie de signalisation Hippo chez les mammifères	- 19 -
1) Composants de la cascade de signalisation	- 19 -
2) Les mécanismes activateurs des kinases	- 19 -
C. Machinerie transcriptionnelle de la voie hippo	- 22 -
1) Facteur de transcription TEAD, partenaire favori de YAP dans la régulation de la transcription	- 22 -
2) YAP en réseau avec d'autres voies de signalisation	- 23 -
D. Les régulateurs de la voie Hippo	- 28 -
1) Polarité des cellules et jonctions cellulaires	- 29 -
2) Forces mécaniques et cytosquelette	- 30 -
3) Facteurs solubles	- 31 -
4) Signaux de stress cellulaires	- 31 -
E. Implication de la voie Hippo dans le développement	- 33 -
1) Développement embryonnaire	- 34 -
2) Contrôle de la taille des organes	- 34 -
3) Régénération tissulaire	- 35 -
4) Remodelage osseux	- 35 -
F. Pathologies associées à la voie Hippo	- 36 -
1) Fibrose	- 36 -

2) Cancer	- 37 -
3) Implication de la voie de signalisation Hippo dans la biologie des sarcomes	- 53 -
G. Molécules et inhibiteurs chimiques ciblant la voie hippo	- 55 -
III. Objectifs de la thèse	- 57 -
Résultats	- 61 -
Discussion et Perspectives	- 112 -
I. YAP interagit avec TEAD pour induire la croissance tumorale	- 113 -
II. YAP stimule la dissémination métastatique indépendamment de TEAD	- 118 -
A. YAP initie le processus d'EMT dans l'ostéosarcome	- 118 -
1) YAP et la voie du TGF- β	- 119 -
2) YAP et la voie Wnt/b-caténine	- 120 -
B. YAP induit un changement phénotypique pro-migratoire dans l'ostéosarcome	- 122 -
C. YAP induit le remodelage de la MEC	- 123 -
D. YAP semble stimuler l'angiogénèse dans l'ostéosarcome	- 125 -
E. Conclusion	- 126 -
III. Mécanismes de résistance dans l'ostéosarcome	- 128 -
A. La voie Hippo dans la résistance de l'ostéosarcome aux chimiothérapies	- 129 -
1) YAP et les transporteurs ABC	- 131 -
2) YAP et la voie des PI3K	- 132 -
3) YAP et la matrice extracellulaire	- 134 -
4) YAP et le cytosquelette d'actine	- 136 -
B. Etude d'un inhibiteur de YAP dans la résistance de l'ostéosarcome aux agents cytotoxiques.	- 137 -
Conclusion générale	- 142 -
Références bibliographiques	- 144 -
Articles scientifiques	- 182 -

TABLE DES FIGURES

FIGURE 1 : IMAGE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'OSTEOBLASTES TAPISSANT LA TRAME OSSEUSE.	2 -
FIGURE 2 : IMAGE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'OSTEOCLASTE DEGRADANT LA MATRICE OSSEUSE.	3 -
FIGURE 3 : ETAPES DU REMODELAGE OSSEUX.	4 -
FIGURE 4 : LOCALISATIONS PREFERENTIELLES DES OSTEOSARCOMES	7 -
FIGURE 5 : ASPECT RADIOLOGIQUE ET HISTOLOGIQUE DE L'OSTEOSARCOME	12 -
FIGURE 6 : STRATEGIES MOLECULAIRES CIBLANT DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION DANS LE TRAITEMENT DES OSTEOSARCOMES	16 -
FIGURE 7 : FRISE CHRONOLOGIQUE DEPUIS LA DECOUVERTE DE LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO CHEZ LES MAMMIFERES JUSQU'A AUJOURD'HUI	19 -
FIGURE 8 : VOIE DE SIGNALISATION HIPPO CHEZ LES MAMMIFERES.	21 -
FIGURE 9 : MACHINERIE TRANSCRIPTIONNELLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO.	28 -
FIGURE 10 : MECANISMES REGULATEURS DE LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO.	33 -
FIGURE 11 : LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO A UN ROLE ONCOGENE DANS DIFFERENTS CANCERS.....	39 -
FIGURE 12 : TRANSITION EPITHELIAUX-MESENCHYMATEUSE (EMT).	44 -
FIGURE 13 : EMT- « LIKE »	45 -
FIGURE 14 : LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO COOPERENT AVEC LA VOIE DU TGF-B/SMADS POUR INITIER L'EMT.....	47 -
FIGURE 15 : LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO FAVORISE LA DISSEMINATION METASTATIQUE.....	49 -
FIGURE 16 : LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO PARTICIPE AUX MECANISMES DE RESISTANCES AUX AGENTS DE CHIMIOTHERAPIE.....	53 -
FIGURE 17 : OBJECTIFS DE CETTE ETUDE.....	59 -
FIGURE 18 : SCHEMA REPRESENTANT LE ROLE MAJEUR DE YAP DANS LE CONTROLE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE MEDIEE PAR KRAS	114 -
FIGURE 19 : LA SUREXPRESSION DE YAP CONSTITUTIVEMENT ACTIF DANS L'OSTEOSARCOME S'ACCOMPAGNE D'UNE SIGNATURE GENIQUE KRAS. .-	116 -
FIGURE 20 : YAP ENTRAINE L'EXPRESSION DE GENES CIBLES DE LA VOIE WNT/B-CATENINE	121 -
FIGURE 21 : LA SUREXPRESSION DE YAP S'ACCOMPAGNE D'UNE SIGNATURE GENIQUE PRO-ANGIOGENIQUE	126 -
FIGURE 22 : TESTS DE VIABILITES SUR LIGNEES D'OSTEOSARCOME RESISTANTES A LA CISPLATINE ET A LA DOXORUBICINE	130 -
FIGURE 23 : SUREXPRESSION DES GENES CIBLES DE LA VOIE HIPPO DANS LES LIGNEES RESISTANTES AUX CHIMIOTHERAPIES COMPAREE AUX CELLULES NAÏVES.....	130 -
FIGURE 24 : INHIBITION DE L'EXPRESSION DES KINASES INHIBITRICES DE LA VOIE HIPPO DANS LES LIGNEES RESISTANTES AUX CHIMIOTHERAPIES COMPAREE AUX CELLULES NAÏVES.	131 -
FIGURE 25 : YAP SEMBLE AUGMENTER L'EXPRESSION DES TRANSPORTEURS ABC.....	132 -
FIGURE 26 : LA RESISTANCE A LA CHIMIOTHERAPIE SEMBLE AUGMENTER LA SIGNALISATION PI3K DANS L'OSTEOSARCOME	134 -
FIGURE 27 : LA RESISTANCE A LA CHIMIOTHERAPIE SEMBLE AUGMENTER L'EXPRESSION DE GENES DE LA MEC DANS L'OSTEOSARCOME	135 -
FIGURE 28 : LA RESISTANCE A LA CHIMIOTHERAPIE SEMBLE AUGMENTER L'EXPRESSION DE GENES DU CYTOSQUELETTE DANS L'OSTEOSARCOME	137 -
FIGURE 29 : LE CA3 SEMBLE INHIBER LA VOIE DE SIGNALISATION HIPPO ET LA PROLIFERATION CELLULAIRE <i>IN VITRO</i> DANS L'OSTEOSARCOME.....	139 -
FIGURE 30 : LE CA3 INHIBE LA CROISSANCE TUMORALE DE L'OSTEOSARCOME <i>IN VIVO</i> ET SEMBLE AVOIR UN EFFET SYNERGIQUE AVEC LA CISPLATINE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE <i>IN VITRO</i>	141 -

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

AMPK: AMP-activated protein kinase

AP-1: Activator protein A

ARNm: Acides ribonucléiques messagers

BRAFi: inhibiteurs de BRAF

BSP: Bone Sialoprotein

CDK4: Cyclin-dependent kinase 4

CTGF: Connective tissue growth factor

CXCR4: Chemokine (C-X-C motif) receptor 4

DKK1: Dickkopf WNT

EGF: Epidermal growth factor

EMT: Transition épithélio-mésenchymateuse

Erk: Extra-cellular regulated kinase

FACs: Fibroblastes associés au carcinoma

FGF: Fibroblast growth factor

GPCRs: Récepteurs aux protéines G

HIF-1: Hypoxia inducible factor

IAP: protéine anti-apoptotique

ICM: Masse cellulaire interne

IRM: Imagerie par résonance magnétique

LAP: Latency associated protein

LAST1/2: Large Tumor Suppressor ½

LPA: acide lysophosphatidique

LTBP: Latent-TGF-β binding protein

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

M-CSF: Macrophage Colony Stimulating Factor

MDM2: Mouse double minute 2 homolog

MDR: Multidrug resistance

MEC: matrice extracellulaire

MEKi: inhibiteurs de MEK

MMPs: Matrix metalloproteinase

MSC: Cellules souches mésenchymateuses

MST1/2: Mammalian Ste20-like Kinase ½

NF-κB: nuclear factor kappa B)

OCN: Ostéocalcine

OPG: Ostéoprotégérine

OPN: Ostéopontine

PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1

PDGF: Platelet-derived growth factor

PDGFR: Récepteur au PDGF

RANK: Receptor activator of nuclear factor kappa B

RANKL: Receptor activator of nuclear factor Kappa B ligand

Rb: Retinoblastome

Runx2: Runt related gene 2

S1P: sphingosine-1-phosphate

SARAH: Sav/Rassf/Hpo

SBE: Smad binding element

Smurf: Smad ubiquitination regulatory factor

TAZ: Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif

TE: Trophectoderme

TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase

VEGF: Vascular endothelial growth factor

YAP: YES-associated protein

INTRODUCTION

I. Ostéosarcomes

A. Le tissu osseux

Le tissu osseux est un tissu conjonctif caractérisé par la nature solide de sa matrice extracellulaire (MEC) capable de supporter des contraintes mécaniques. Il constitue ainsi une véritable « charpente » de l'organisme, protège les organes vitaux et les structures internes, et permet la locomotion. Ce tissu osseux constituant le tissu de support de l'ostéosarcome, nous nous intéresserons brièvement à ses principales caractéristiques.

1) Les cellules osseuses

Le tissu osseux est une structure dynamique en perpétuel remaniement, en grande partie sous le contrôle de deux types cellulaires ; les ostéoblastes et les ostéoclastes.

Les ostéoblastes différenciés sont des cellules ostéoformatrices disposées en monocouche cellulaire sur la surface osseuse. Ces ostéoblastes dérivent de cellules souches mésenchymateuses qui se différencient dans un premier temps en pré-ostéoblastes puis en ostéoblastes matures sous le contrôle de différents facteurs de transcription tel que RUNX2 (runx related transcription factor 2) ou osterix. Progressivement la morphologie des cellules évolue d'une forme de type fibroblastique en des cellules cuboïdes possédant un large noyau et organisées à la surface de l'os en un épithélium d'ostéoblastes matures qui synthétisent le tissu ostéoïde. Les ostéoblastes matures expriment alors des marqueurs tel que la BSP (Bone Sialoprotein) l'ostéopontine ou l'ostéoclastine^{1,2}. Ces cellules ont la capacité de produire du collagène de type I représentant 95% de la matrice ostéoïde.

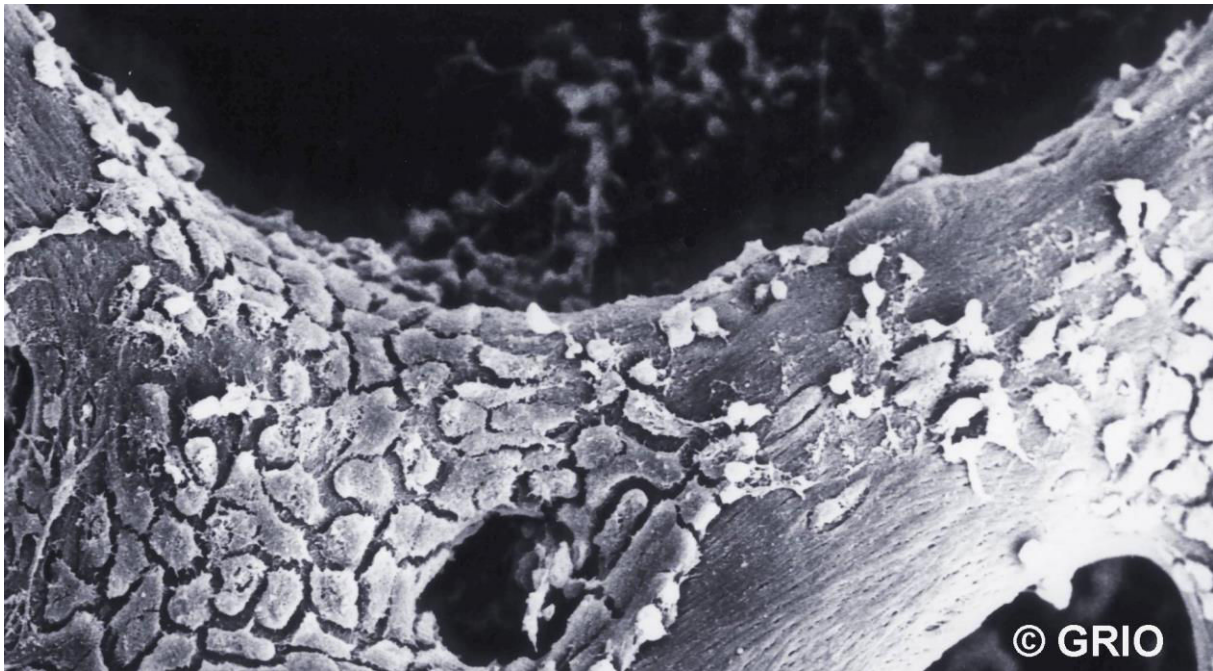


Figure 1 : Image en microscopie électronique à balayage d'ostéoblastes tapissant la trame osseuse.

D'après le site internet : <http://www.grio.org/iconographie-os.php>

Les ostéoclastes qui participent à la résorption osseuse, ont des caractéristiques similaires aux macrophages. Ce sont des cellules géantes, multi-nucléés et localisées à la surface de l'os dérivant de précurseurs hématopoïétiques mononucléés de type monocytaire. La différenciation ostéoclastique est étroitement régulée par différents facteurs de transcription (PU-1, c-fos, NF- κ B (nuclear factor kappa B)) en réponse à certains facteurs dont les principaux sont le M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) et RANKL. Les ostéoclastes matures sont des cellules géantes multinucléées possédant un appareil de Golgi très développé, de nombreuses mitochondries péri-nucléaires et sont riches en enzymes lysosomales telles que TRAP (Tartrate Resistant Acide Phosphatase) ou la cathepsine K ainsi qu'en métalloprotéases, nécessaires à la dégradation osseuse.

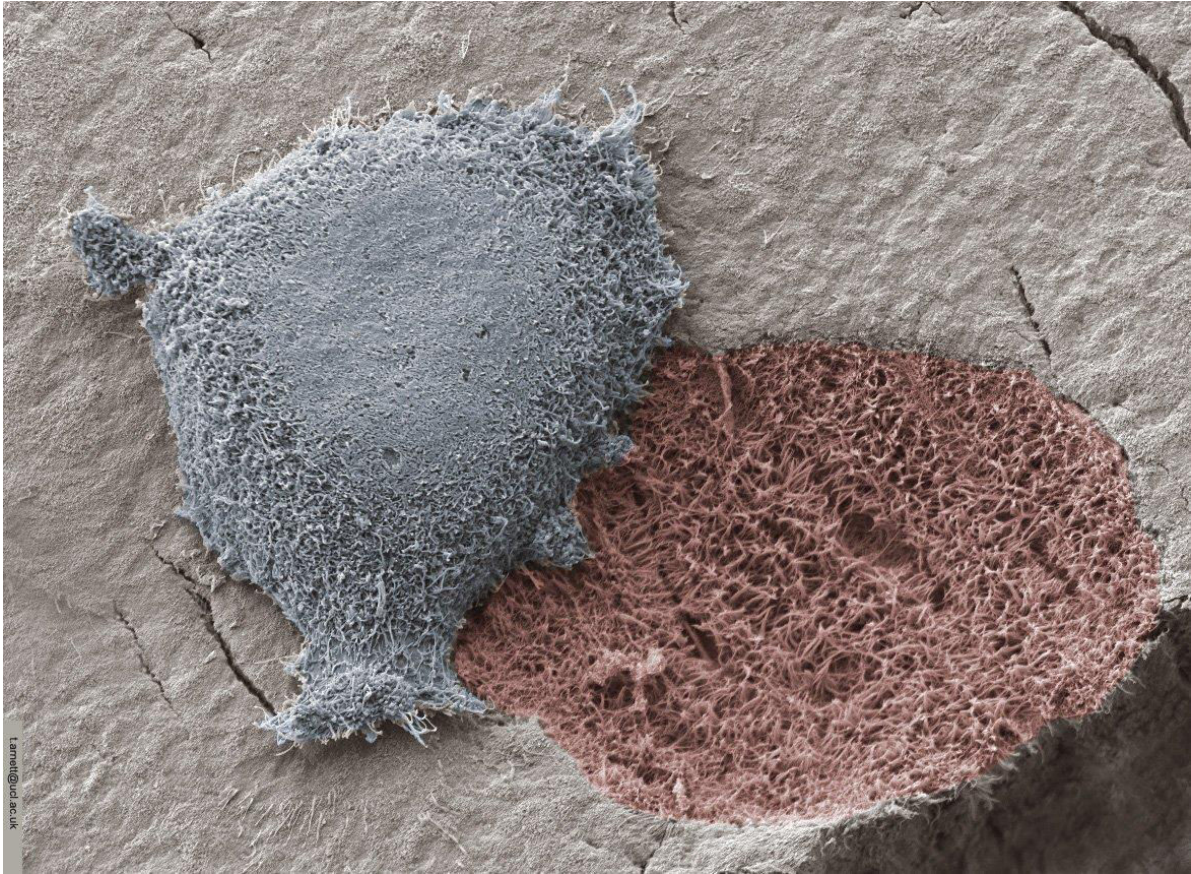


Figure 2 : Image en microscopie électronique d'ostéoclaste dégradant la matrice osseuse.

D'après le site internet : <https://boneresearchsociety.org/resources/gallery/>

2) Le remodelage osseux

De façon coordonnée, les ostéoblastes et ostéoclastes participent au remodelage osseux du fait du processus de résorption du tissu existant et de son remplacement par une nouvelle matrice osseuse. Ce processus, essentiel à la réparation des dommages osseux, se compose de 6 phases successives. ³⁻⁵

Dans un premier temps, la phase d'**activation**. Des ostéoclastes immatures sont recrutés depuis la circulation sanguine puis activés. Ils reconnaissent la surface de l'os à résorber et de nombreux ostéoclastes mononucléés fusionnent pour former des pré-ostéoclastes multinucléés qui se fixent alors à la matrice osseuse.

Arrive ensuite la phase de **résorption**, qui peut durer environ deux semaines. Pendant cette phase, les ostéoclastes matures libèrent des enzymes protéolytiques grâce à l'action de

pompes à protons. La matrice osseuse, riche en collagène, est dégradée par des protéases telles que la cathepsin K ou bien des métalloprotéinases (MMPs).

La phase d'**inversion** est une transition entre la phase de résorption et la phase de formation. Elle débute par la mort des ostéoclastes par apoptose, des cellules de type macrophagiques viennent alors nettoyer la lacune osseuse. Ainsi, la surface osseuse fraîchement résorbée est lissée et prête pour la formation d'une nouvelle matrice.

La libération de facteurs pro-ostéoblastiques suite à la dégradation de la matrice tels que les BMPs, les FGFs, ou les TGF- β s stimulent alors la **formation** ostéoblastique. Au cours de cette phase, les ostéoblastes différenciés synthétisent et secrètent une matrice riche en collagène de type I. Cette matrice est ensuite minéralisée par le dépôt de cristaux d'hydroxyapatite le long des fibres de collagène.

Vient alors la phase de **terminaison**, les ostéoblastes meurent par apoptose, se transforment en cellules quiescentes et tapissent la surface de l'os, ou sont ensevelis dans la matrice osseuse nouvellement formée et deviennent des ostéocytes. On rentre alors dans la phase de **quiescence**. Ces ostéocytes jouent un rôle majeur dans la signalisation de la fin du remodelage par la sécrétion d'antagonistes à l'ostéogenèse.

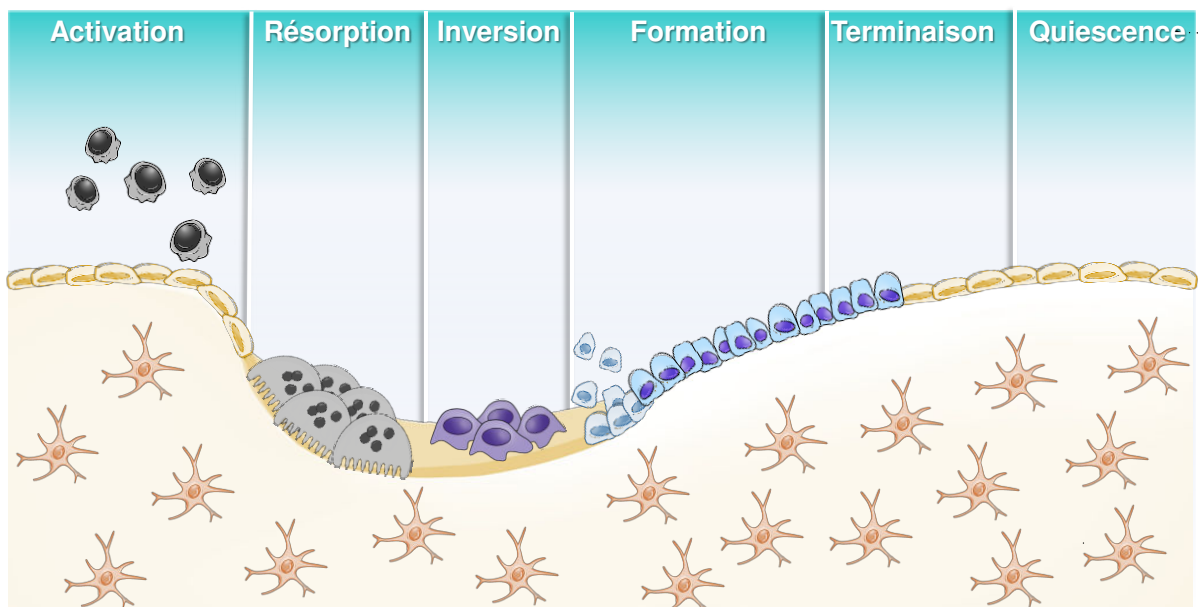


Figure 3 : Etapes du remodelage osseux.

Dans des conditions dites physiologiques, le processus de remodelage osseux contribue à maintenir un équilibre entre la résorption osseuse et la formation osseuse. La rupture de cet équilibre participe au développement de différentes pathologies osseuses bénignes ostéocondensantes (comme l'ostéopétrose) ou ostéolytiques (comme l'ostéoporose), ou malignes (ostéosarcomes, sarcomes d'Ewing, chondrosarcomes...).

B. Epidémiologie

L'ostéosarcome est la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives chez les enfants et jeunes adultes, en comparaison avec le sarcome d'Ewing qui est la plus fréquente des tumeurs osseuses chez les enfants de moins de 10 ans. L'incidence de l'ostéosarcome est d'environ 4 cas par million par an chez les enfants et jeunes adultes de moins de 20 ans. Ce cancer représente environ 35% des cas, suivis par le chondrosarcome (25% des cas) et le sarcome d'Ewing (16% des cas). Parmi les cancers pédiatriques, l'ostéosarcome se place en huitième position après les lymphomes et les tumeurs du cerveau. L'incidence de l'ostéosarcome est plus haute chez les garçons que chez les filles, avec environ 1.5 fois à 2 fois plus de cas chez les garçons. ⁶⁻⁸

L'ostéosarcome a deux pics d'occurrence, le premier pendant l'adolescence, le second à l'âge adulte. L'ostéosarcome reste très rare chez l'enfant de moins de 5 ans, avec seulement 2% des cas. Entre 11 et 15 ans le risque de développer un ostéosarcome est plus accru, ce qui correspond à la période de croissance lors de la puberté. Il existe un second pic d'incidence chez l'adulte après 65 ans, qui est souvent une maladie secondaire, fréquemment liée à d'autres pathologies du remodelage osseux tel que la maladie de Paget.

Lors du diagnostic, environ 20% des patients présentent des métastases, le plus fréquemment au niveau des poumons, mais des métastases osseuses et ganglionnaires peuvent également exister. ^{7,9,10}

Avant les années 1970, l'amputation était le seul traitement des ostéosarcomes, 80% des patients décédaient à la suite de la dissémination métastatique, menant à la conclusion que 80% des patients présentent des micro-métastases indétectables au diagnostic. La mise en place de protocoles de chimiothérapie composés de hautes doses de méthotrexate associés à de la vincristine suivie par de l'acide folique a entraîné une augmentation

significative de la survie des patients qui ne présentaient pas de métastases visibles au diagnostic.¹¹⁻¹⁴

C. Différents types d'ostéosarcomes

L'ostéosarcome est une tumeur d'origine mésenchymateuse puisqu'elle dérive du mésoderme et semble issu des MSC¹⁵. L'ostéosarcome exprime RUNX2¹⁶, ALP, OCN et BSP. Il aurait pour origine une dérégulation du programme de différenciation des MSC. Différents degrés de différenciation peuvent être retrouvés dans cette pathologie.

Selon la définition de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'ostéosarcome est « une tumeur maligne caractérisée par l'élaboration d'os ou de substance ostéoïde par les cellules tumorales ». Selon cette définition, une production d'os, même minime, suffit pour parler d'ostéosarcome. L'ostéosarcome présente en réalité une grande variété de lésions distinctes par leur présentation clinique et radiographique, leur aspect microscopique et leur évolution, conduisant à définir cette pathologie comme une tumeur très hétérogène.

L'ostéosarcome peut apparaître sur tous les os, mais le site le plus fréquent est au niveau de la métaphyse des os longs près de la plaque de croissance, les épiphyses et diaphyses sont rarement touchées. Les sites les plus fréquents sont le fémur (48% des cas), le tibia (27%) et l'humérus (15%). Plus rarement l'ostéosarcome se développe au niveau des os du crâne ou de la face (8% des cas) et du pelvis (8%). Seulement 1% des cas d'ostéosarcomes est situé au niveau des côtes.

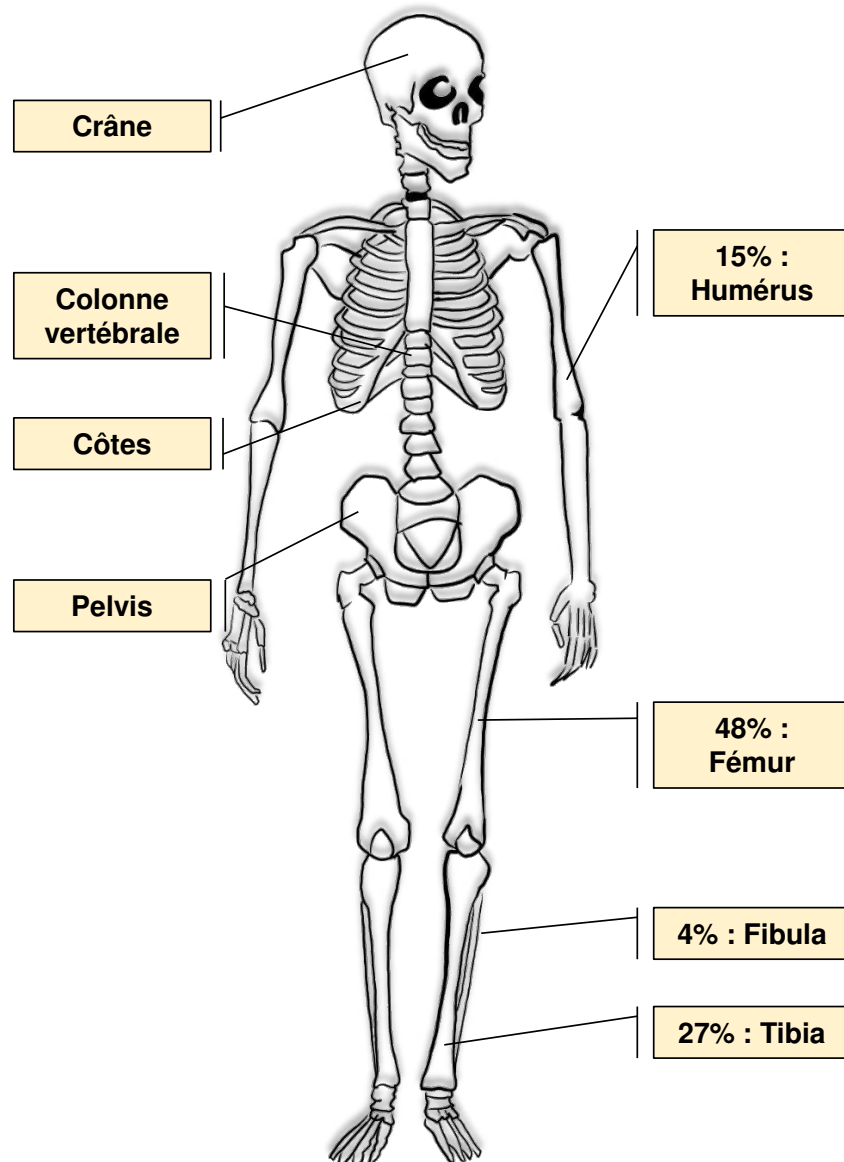


Figure 4 : Localisations préférentielles des ostéosarcomes

On distingue plusieurs types d'ostéosarcome selon leur localisation à l'os. L'organisation mondiale de la santé divise les ostéosarcomes en trois types : les ostéosarcomes centraux ou intramédullaires, les ostéosarcomes intra-corticaux et les ostéosarcomes de surface.

Parmi les ostéosarcomes centraux,

- On retrouve l'ostéosarcome dit conventionnel qui est le plus commun et représente 80% des cas apparaissant dans les 20 premières années de la vie. Ces ostéosarcomes

se divisent en plusieurs sous types : ostéoblastique, chondroblastique et fibroblastique. C'est la forme la plus agressive d'ostéosarcome, ayant pour origine la cavité intra-médullaire.

- L'ostéosarcome télangiectasique représente 4% des ostéosarcomes, c'est une forme caractérisée par des lésions lytiques associées à de multiples fractures. Le pronostic vital est moins bon que la forme centrale.
- L'ostéosarcome à petites cellules représente 1 à 2% des ostéosarcomes. L'aspect histologique présente des petites cellules rondes, la tumeur est caractérisée par une production de matrice ostéoïde associée à des plages de lyse.
- Enfin, les ostéosarcomes de bas grades, constituent 1 à 2% des ostéosarcomes, affectent plus généralement les adultes après 30 ans. C'est une forme rare et particulière, difficile à diagnostiquer, caractérisée par une évolution lente et un pronostic favorable. Cette forme peut dériver en ostéosarcome conventionnel si elle n'est pas traitée.

Les ostéosarcomes intra-corticaux sont les formes les plus rares, caractérisés par une matrice ostéoïde.

Parmi les ostéosarcomes de surface on distingue deux sous types :

- L'ostéosarcome parostéal : un ostéosarcome de bas grade qui prend origine dans le périoste. Il représente 4 à 6% des cas.
- L'ostéosarcome périostale, caractérisé par une matrice cartilagineuse, moins fréquent que l'ostéosarcome parostéal.
- L'ostéosarcome de surface de haut grade, qui constitue moins de 1% des ostéosarcomes. Ce sous type est caractérisé par des lésions de surface associées à une apparence histologique agressive.

D. Étiologie et facteurs de risques

L'étiologie des ostéosarcomes reste largement inconnue aujourd'hui, cependant des études sont menées pour déterminer des causes environnementales ou génétiques. Aujourd'hui, les facteurs de risque connus associés au développement des ostéosarcomes comprennent les radiations ioniques, les agents alcalins, la maladie de Paget, le rétinoblastome ainsi que le syndrome de Li-Fraumeni. Cependant, différents facteurs de

risque environnementaux ont été mis en évidence, aucun ne pouvant être considéré comme spécifique au développement d'un ostéosarcome, mais tous devant être pris en compte comme facteurs aggravants.

1) Caractéristiques physiologiques

L'ostéosarcome apparaît le plus fréquemment entre 10 et 15 ans, pendant la phase de croissance rapide des os longs. Le premier pic d'incidence de l'ostéosarcome correspond à la période de croissance lors de la puberté, suggérant une relation étroite entre la croissance rapide et le développement de la maladie. L'incidence plus élevée chez les garçons correspond à la phase de croissance très rapide lors de la puberté. De plus, l'apparition d'un ostéosarcome est plus fréquente chez les personnes de grande taille.

2) Facteurs génétiques et familiaux /anomalies cytogénétiques

Les ostéosarcomes sont caractérisés par de nombreuses mutations et réarrangements génomiques très complexes et diverses, ce qui a rendu impossible la mise en évidence d'une aberration chromosomique récurrente et spécifique caractérisant l'ostéosarcome. L'étude génomique des ostéosarcomes a mis en avant différentes aberrations chromosomiques¹⁷⁻¹⁹.

Les cellules tumorales sont constituées de multiples altérations génétiques basées sur l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, particulièrement p53 altéré dans 50% des cas et la protéine Rb altérée dans 70% des cas. Enfin, le pro-oncogène c-myc et le facteur de transcription AP-1 sont activés dans certains cas d'ostéosarcome.

Le rétinoblastome est fréquemment associé au développement d'un ostéosarcome tardif. Il existe une forte disposition génétique au développement d'un ostéosarcome chez les patients atteints d'un rétinoblastome héréditaire, caractérisé par une mutation germinale du gène RB1 associé à un pronostic vital moins bon que les patients n'ayant pas de mutation RB1. Le risque de développer un ostéosarcome à 20 ans après avoir été diagnostiqué d'un rétinoblastome bilatéral est de 12.1%, reflétant la combinaison de prédisposition génétique à de multiples cancers ainsi qu'aux effets de la radiothérapie utilisée pour le traitement des rétinoblastomes.^{7,20,21}

Le syndrome de Li-Fraumeni est une pathologie héréditaire autosomale dominante causée par la mutation du gène suppresseur de tumeur p53, elle est à l'origine d'une

prédisposition très forte au développement de différents types de tumeurs chez l'enfant. Ce syndrome est retrouvé chez 3% des patients atteints d'ostéosarcome. ²²⁻²⁴

La maladie de Paget qui est une pathologie présentant un remodelage osseux intense principalement chez les personnes âgées peut être à l'origine du développement d'ostéosarcome (environ 1% des cas)²⁵.

Enfin, Le syndrome de Rothmund-Thomson, causé par la mutation du gène RECQL4 codant pour une protéine de la famille des RecQ-hélicase, prédispose au développement d'un ostéosarcome. ^{7,24,26}

3) Facteurs environnementaux

Un ostéosarcome peut se développer après une répétition d'expositions à des radiations ionisantes, celles-ci sont impliquées dans 3% des cas d'ostéosarcome, souvent associées à une maladie secondaire chez un patient. L'intervalle entre l'irradiation et l'apparition de la maladie se situe entre 12 et 20 ans. L'exposition à certains agents alcalins contribue au développement des ostéosarcomes, indépendamment de la radiothérapie. Les patients ayant eu un sarcome d'Ewing ont un plus haut risque de développer par la suite un ostéosarcome dû aux doses très élevées de radiations ionisantes associées à une chimiothérapie constituée d'agents alcalins (cisplatine, cyclophosphamide). D'autres facteurs de risques environnementaux tels que des expositions aux rayons X avant la naissance ont été mis en évidence. ^{17,27}

E. Clinique

1) Diagnostic

Les patients atteints d'ostéosarcomes présentent typiquement des douleurs persistantes dans une zone localisée, habituellement ressenties après une blessure. La douleur peut aller et venir sans disparaître totalement, et est souvent plus intense la nuit. Le diagnostic peut être retardé chez les adolescents car la douleur peut être attribuée à tort à des traumatismes sportifs ou à une croissance osseuse rapide. Certains patients se plaignent de symptômes systémiques, tels qu'une perte de poids, de la fièvre ou une fatigue intense. Le premier examen révèle une masse à la palpation, on observe également dans les stades les plus avancés une vascularisation cutanée inhabituelle au niveau de la lésion. Ces symptômes nécessitent un examen clinique plus approfondi, la première étape étant une radiographie de

l'os. On peut observer des lésions ostéolytiques typiques de l'ostéosarcome ainsi que des structures en « feux d'herbe », réaction du périoste à la progression tumorale. S'en suit un examen plus approfondi par imagerie à résonance magnétique (IRM) pour définir l'étendu de la tumeur et la formation de métastases adjacentes. L'IRM permet d'optimiser la chirurgie nécessaire pour obtenir une biopsie. Un examen des poumons par CT scan est également nécessaire pour détecter d'éventuelles métastases pulmonaires. ^{9,10,28,29}

Le diagnostic de l'ostéosarcome est confirmé par biopsie, réalisée par un oncologue orthopédiste. Elle est analysée par cytogénétique et histopathologie, même s'il n'y a aujourd'hui aucun marqueur immunohistochimie ni d'analyse cytogénétique spécifique de l'ostéosarcome. On observe une cellularité très importante, des mitoses anormales, et la présence d'ostéoformation sous forme d'os lamellaire d'agencement anarchique.

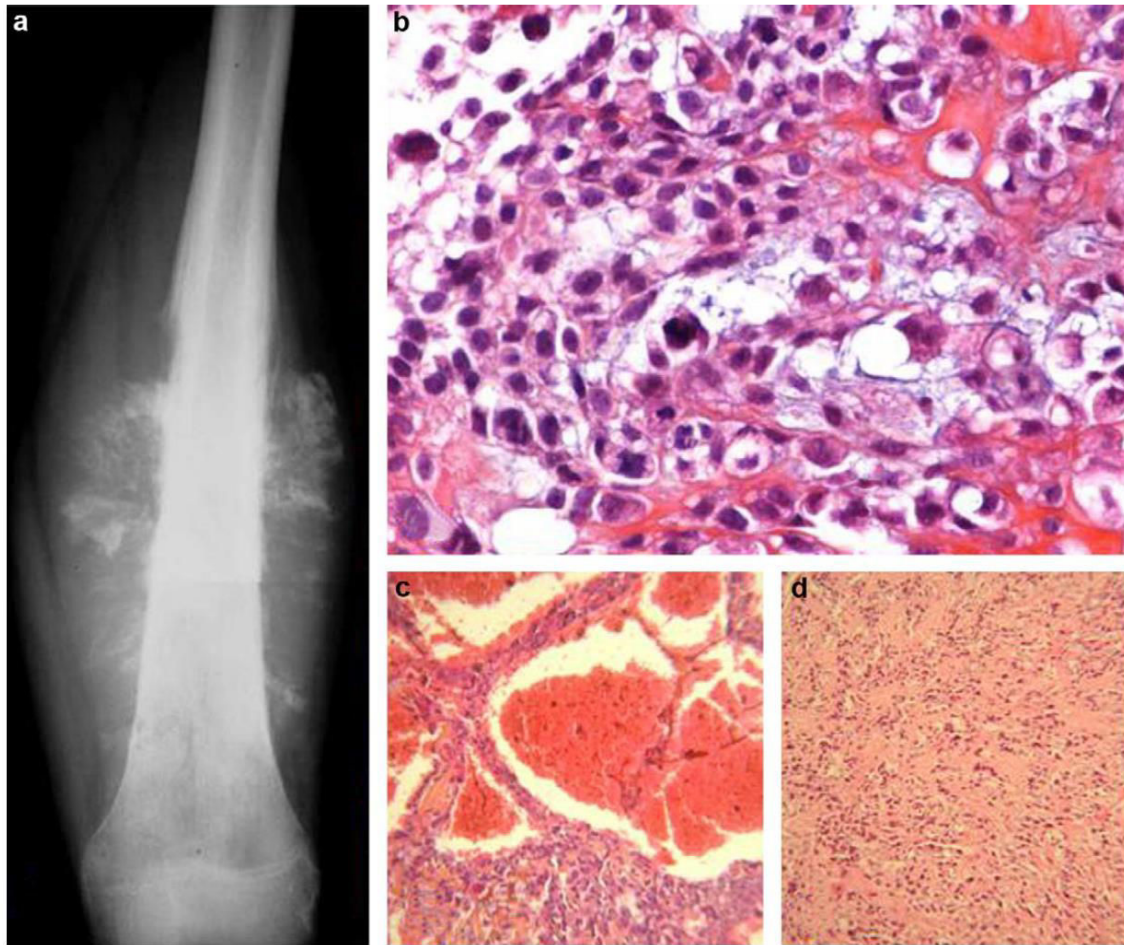


Figure 5 : Aspect Radiologique et histologique de l'ostéosarcome

a : radiographie d'un ostéosarcome. Territoires denses et floconneux. Réaction périostée en feu d'herbe ; b : ostéosarcome conventionnel de haut grade de malignité ostéoblastique et chondroblastique. Cellules tumorales avec des atypies cytonucléaires marquées, hyperchromatisme et mitoses. Élaboration d'une matrice ostéoïde peu abondante (réseau en dentelle) (HE × 200) ; c : ostéosarcome télangiectasique. Espaces kystiques remplis de sang. Cellules atypiques et mitoses anormales dans les septas. Production ostéoïde faible (HE × 200) ; d : ostéosarcome à petites cellules. Cellules rondes dissociées dans un stroma fibreux et ostéoïde (HE × 200)

D'après Anne Gomez-Brouchet et. Al, 2011³⁰

2) Traitements actuels

Après le diagnostic confirmé, les patients atteints d'ostéosarcome de hauts grades sont traités à l'aide d'approches multidisciplinaires reliant les orthopédistes et les oncologues. Le protocole standard consiste en une polychimiothérapie néoadjuvante d'environ 13 semaines permettant de réduire le volume tumoral facilitant la chirurgie résectrice (incluant toutes les métastases pouvant être retirées chirurgicalement). La réponse histologique à la chirurgie préopératoire est un facteur de prédiction de la survie du patient. L'amputation qui était avant

une règle plus qu'une exception, est maintenant remplacée dans 80% des cas par une chirurgie partielle préservant le membre du patient.²⁶

Après la chirurgie, le protocole de chimiothérapie est déterminé en fonction du pourcentage de cellules viables sur la pièce de résection. Ce pourcentage de cellules tumorales résiduelles permet d'établir le grade de Huvos, une classification histo-pronostique universelle. Ce classement permet de déterminer la qualité de la réponse à la chimiothérapie du patient et d'adapter son traitement³¹.

Tableau 1 : Classification pronostique suivant le grade de Huvos selon le degré de réponse à la chimiothérapie

Grade	Pourcentage de cellules tumorales viables
I	≥ 95 %
IIa	50 à 94%
IIb	11 à 49 %
III	1 à 10%
IV	0

Le traitement de référence européen, la « MAP », est une association de doxorubicine, cisplatine et de méthotrexate à haute dose, et est habituellement utilisé pour traiter les enfants et jeunes adultes atteint d'ostéosarcome. Dans le cas d'une mauvaise réponse histologique après la chimiothérapie préopératoire, les oncologues ajoutent généralement au protocole de MAP de l'ifosfamide et de l'étoposide. Des études ont montré que l'ajout de ces deux nouvelles chimiothérapies n'améliore pas la survie comparée aux patients traités avec la MAP seule. Cependant, ces deux molécules ont été testées dans le cadre d'ostéosarcomes récurrents ou présentant des métastases pulmonaires en rechute. Il a alors été observé une augmentation de la survie d'environ 30%.^{9,32}

En France le traitement actuel est composé d'une phase de chimiothérapie néo-adjuvante comprenant des cycles d'administration de méthotrexate à haute dose associé à de l'étoposide et de l'ifosfamide pendant 13 semaines. La chirurgie résectrice permet d'établir le niveau de réponse des patients aux chimiothérapies grâce au grade de Huvos, les bons répondeurs (grade III et grade IV) subissent un protocole de chimiothérapie identiques à la

première phase. Les mauvais répondeurs (grade I, IIa, et IIb) ont un protocole de chimiothérapie composé de méthotrexate à haute dose, de doxorubicine (adriamycine) et de cisplatine³³.

Les patients ayant des métastases lors du diagnostic reçoivent le même protocole de chimiothérapie que les patients ayant des formes localisées, malheureusement il n'existe aujourd'hui que peu d'options pour traiter ces patients au diagnostic sombre. En effet, le taux survie à 5 ans pour les patients ayant une forme d'ostéosarcome localisée est d'environ 75%, mais chute à 25% lorsque des nodules métastatiques sont déjà présents au diagnostic. Environ 35% des patients ayant un ostéosarcome localisé au moment du diagnostic rechutent, 90% d'entre eux auraient des micro-métastases associées à une maladie hémotogène. Le taux de survie après une récurrence de l'ostéosarcome est d'environ 25% à 5 ans^{9,34}.

Le suivi des patients après les traitements est indispensable pour détecter d'éventuels rechutes localisées ou métastatiques. Le suivi de l'ostéosarcome doit inclure un examen au site de la tumeur primaire ainsi qu'une physiothérapie pour améliorer les fonctions locomotrices à la suite de la chirurgie. Un suivi par imagerie thoracique est recommandé pour détecter d'éventuelles métastases pulmonaires, environ tous les 3 mois les deux premières années, tous les 6 mois les trois années suivantes puis tous les 6 mois à un an les 5 à 10 dernières années⁹.

Les chimiothérapies utilisées sont associées à des effets secondaires très néfastes à court terme, les plus communs étant l'alopecie, la suppression du système immunitaire, une infection des muqueuses, associées à des nausées et vomissement.

Mais il est également très important d'évaluer les effets à long terme des chimiothérapies très toxiques administrées à hautes doses. Tous les patients survivant à l'ostéosarcome ont au moins un effet secondaire chronique.

La doxorubicine peut entraîner une toxicité cardiaque, l'ifosfamide est associé à une toxicité rénale aiguë ou chronique. La cisplatine induit également des toxicités rénales et peut provoquer une perte d'audition. Enfin, le méthotrexate à haute dose est à l'origine de nausées, vomissement, dysfonctions hépatiques, neutropénies et leucopénies. Cette molécule est également neurotoxique.

Un suivi cardiaque à long terme est indispensable et de nombreuses études montrent une détérioration cardiaque pouvant survenir plus de 10 ans après le traitement.^{35,36}

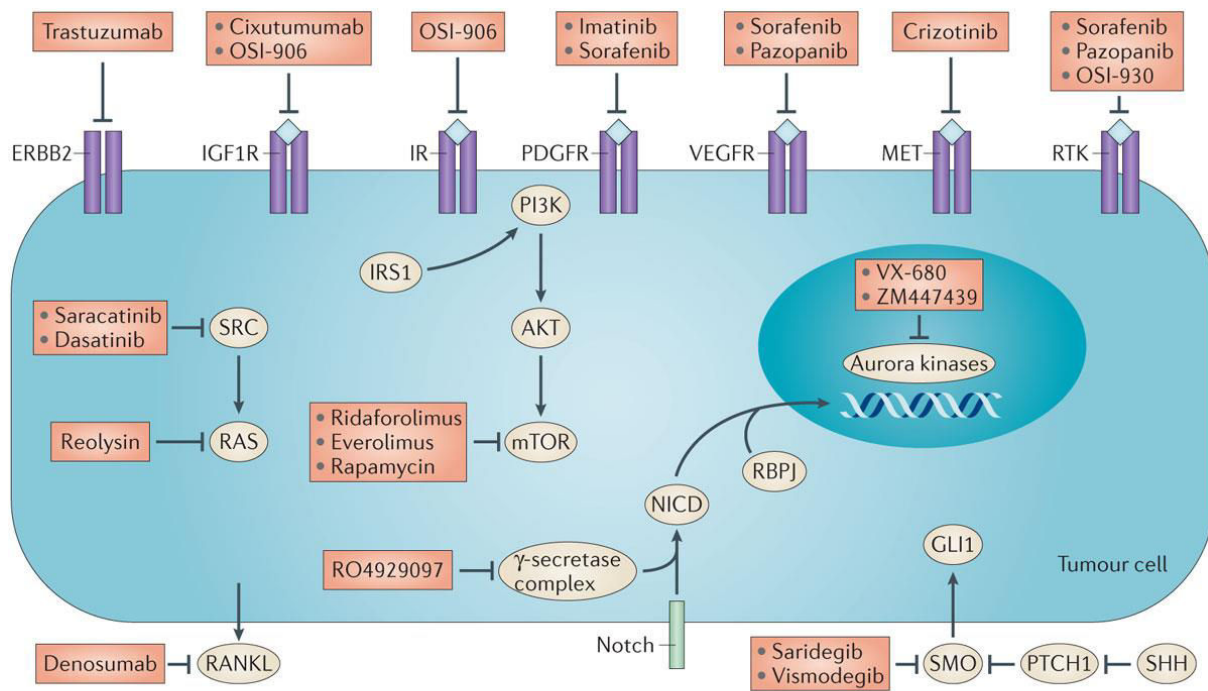
Tous les patients doivent être examinés sur le plan rénal, cardiaque, hématologique et hépatique avant le début du traitement de chimiothérapie afin d'adapter le protocole et prévenir des effets à long terme.

Malgré l'augmentation significative de la survie depuis les années 1970 grâce à l'addition de cocktails de chimiothérapie avant puis après la chirurgie, de nombreux patients demeurent de mauvais répondeurs et rechutent après l'arrêt du traitement, c'est pourquoi il est urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant à la fois la croissance de la tumeur primaire et le développement métastatique.^{13,37-39}

3) Traitements en développement

De nombreuses thérapies innovantes sont développées afin de pallier au manque de traitement pour les patients en rechute ou résistants aux chimiothérapies actuelles.

Des études tant au niveau moléculaire, pour mieux comprendre les mécanismes et potentiels marqueurs de l'ostéosarcome, qu'au niveau clinique, sont décrites dans la revue écrite par Maya Kansara en 2014.²⁶



Nature Reviews | Cancer

Figure 6 : Stratégies moléculaires ciblant différentes voies de signalisation dans le traitement des ostéosarcomes

En France des essais cliniques sont mis en place, pouvant cibler directement les cellules tumorales, le microenvironnement tumoral ou même l'environnement immunitaire.

L'essai clinique français de phase II, REGOBONE étudie chez les patients en échec thérapeutique, l'efficacité de Regorafenib, qui est un inhibiteur de l'activité de certaines Tyrosine Kinase impliquées dans la progression tumorale. Les résultats sont encourageants, 65% des patients traités avec le Regorafenib ne montraient de signes de progression de la maladie après 8 semaines de traitements contrairement aux patients ayant reçu le placebo⁴⁰.

L'ostéosarcome est caractérisé par un microenvironnement osseux associé à un déséquilibre entre l'ostéoformation et l'ostéolyse. De nombreuses cytokines sont sécrétées par les cellules tumorales ce qui stimulent les ostéoclastes et la résorption osseuse. De nombreux facteurs sont libérés de la matrice osseuse et favorisent la progression tumorale. Le ciblage de l'ostéolyse associé à la progression tumorale semble être une approche thérapeutique intéressante. Les biphosphonates sont des inhibiteurs de la résorption osseuse inhibant l'activité des ostéoclastes. L'essai clinique Français OS2006 étudie les effets d'un biphosphonate, l'acide zolédronique, en combinaison avec la chimiothérapie conventionnelle.

Malgré les résultats précliniques encourageant, l'essai clinique a été arrêté car le traitement à l'acide zolédronique ne montrait pas de bénéfice en comparaison au traitement standard. Il a été également observé une augmentation du nombre d'évènements métastatique et une réduction de la survie globale des patients³⁷.

Enfin, il existe des essais cliniques visant spécifiquement le microenvironnement immunitaire. En France, l'essai clinique SARCOMÉ13 ou bien OS2016 évalue la combinaison d'une chimiothérapie adjuvante et du MEPACT® (Mifamurtide) chez des patients ayant un mauvais pronostic (mauvaise réponse à la première chimiothérapie ou présentant des métastases au diagnostic). Cette molécule vise à stimuler l'activité monocyttaire et macrophagique qui sont facteurs de bon pronostic dans l'ostéosarcome⁴¹.

II. Voie de signalisation Hippo

A. Historique

La voie de signalisation Hippo a été découverte au tournant du 21^{ème} siècle, dépeinte comme une voie de régulation de la croissance des tissus chez la drosophile. L'équipe de Noll & Bryant⁴² en 1995 et celle Stewart & Yu⁴³ la même année ont montré des croissances aberrantes et massives des tissus sur des drosophiles ayant une perte de l'expression de la protéine **Wst**. C'est le début d'une vague massive d'études menées sur différents acteurs de cette voie de signalisation. Au début des années 2000, les protéines **Salvador**, **Hippo** et **Mob** sont découvertes.⁴⁴⁻⁴⁶ Une caractérisation fonctionnelle et biochimique de la voie de signalisation « Salvador-Warts-Hippo » est établie^{47,48}, c'est une cascade de phosphorylations par des protéines kinases dans laquelle Hpo phosphoryle et active Wts qui a son tour réprime la transcription de gènes cibles, probablement via un régulateur de la transcription alors inconnu à cette époque. Après ces révélations en 2003 par l'équipe de Duojin Pan, la protéine Yorkie est identifiée, c'est le coactivateur de facteur de transcription et cible directe de Wts, suivie de la découverte de Scalloped, le facteur de transcription partenaire de Yorkie, dernier élément manquant régulant la transcription de gènes cibles⁴⁹⁻⁵¹.

Des homologues des composants de la voie Hippo chez les mammifères comme le coactivateur de facteur de transcription Yes-associated protein (YAP) ont été découverts dans les années 1990⁵², avant même la caractérisation fonctionnelle de la voie chez la drosophile. Néanmoins, les études sur les drosophiles ont été étendues aux mammifères, dessinant la voie de signalisation Hippo décrite par l'équipe de Duoja Pan en 2007^{49,53}.

Une dizaine d'années de recherches intenses ont étendu la cascade de phosphorylation Hippo en un réseau de signalisation complexe, la reliant à différents signaux extracellulaires tel que l'adhésion cellulaire, la polarité ou bien des contraintes mécaniques. Des études récentes ont davantage impliqué la voie Hippo dans divers processus physiologiques et d'autres pathologies, tel que la régulation de la différenciation des cellules souches, la régénération tissulaire mais aussi l'immunité ou bien le cancer.

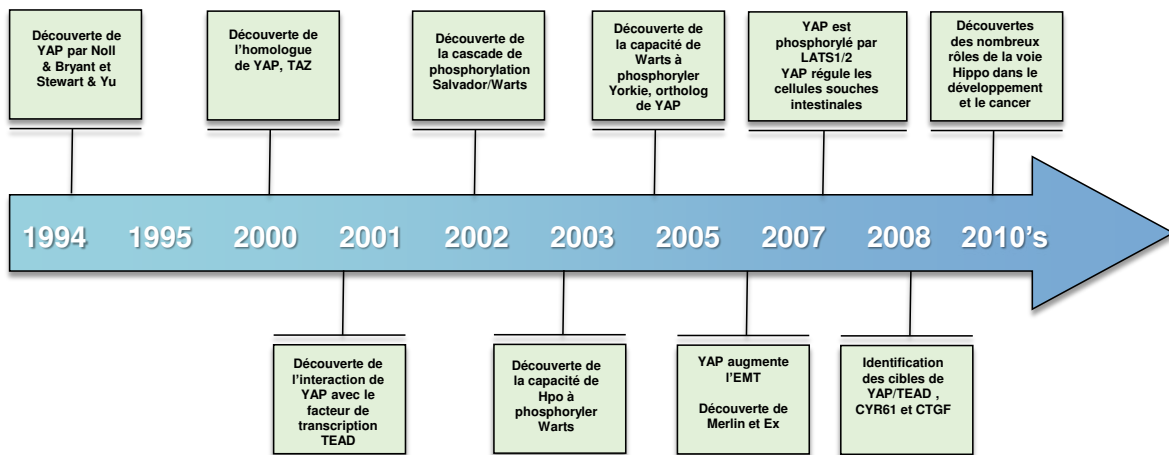


Figure 7 : Frise chronologique depuis la découverte de la voie de signalisation Hippo chez les mammifères jusqu'à aujourd'hui

B. Composants de la voie de signalisation Hippo chez les mammifères

1) Composants de la cascade de signalisation

Le corps de la voie Hippo est une cascade de kinases dans laquelle la protéine « mammalian Ste20-like kinase 1/2 » (MST1/2), phosphoryle et active la protéine « large tumor suppressor 1/2 », (LATS1/2)^{43,54}. Le but de cette cascade de kinases est de restreindre l'activité de deux coactivateurs de la transcription, « Yes-associated protein » (YAP), et « transcriptional co-activator with PDZ-binding motif », TAZ. Quand YAP et TAZ sont non phosphorylés, donc actifs, ils transloquent vers le noyau pour se lier à différents facteurs de transcription, notamment aux protéines TEADs. S'active alors l'expression de différents gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie mais aussi la migration cellulaire⁵⁴⁻⁵⁷.

2) Les mécanismes activateurs des kinases

La cascade de phosphorylation est initiée par la phosphorylation la boucle d'activation de MST1/2 sur la thréonine 183/180, entraînant une activation de MST1/2^{58,59}. Il a été mis en évidence que l'activation de MST1/2 peut être achevée par une autophosphorylation de la protéine, mais aussi par différentes kinases tels que TAO1. La protéine MST1/2 forme un homodimère à son domaine C-terminal : Sav-Rassf-Hpo ou le domaine SARAH. Chaque sous unité de MST1/2 peut activer l'autre sous unité en phosphorylant elle-même la boucle d'activation. La dimérisation de MST1/2 est modulée par deux autres protéines du complexe SARAH : SAV1 et RASSF. SAV1 favorise l'auto-activation de MST1/2, contrairement aux protéines de la famille RASSF qui en formant des hétérodimères avec MST1/2 empêche son activation.^{52,60,61}

La protéine MST1/2 active va alors phosphoryler la protéine SAV1, homologue de Sav chez la drosophile, et MO1A/B, qui sont deux protéines scaffold. Le rôle exact de la protéine SAV1 est encore mal décrit, il a été suggéré que SAV1 peut faciliter l'interaction entre MST1/2 et LATS1/2, ou bien recruter MST1/2 à la membrane des cellules. La protéine MO1A/B est mieux décrite, elle favorise la signalisation en facilitant l'activité kinase de LATS1/2 et la phosphorylation de YAP/TAZ.^{62,63}

Un autre acteur essentiel de cette cascade de phosphorylation est la protéine NF2/Merlin, qui interagit directement avec LATS1/2 et facilite sa phosphorylation par le complexe MST1/2-SAV1. A son tour LATS1/2 est actif et phosphoryle YAP et TAZ sur les sérines respectives S127 et S381, rendant ces protéines inactives. Les coactivateurs de transcription sont séquestrés dans le cytoplasme, la protéine 14-3-3 se fixe et forme un complexe entraînant sa dégradation par le protéasome. Quand la voie Hippo est faiblement active, YAP non phosphorylé entre dans le noyau et conduit à l'expression de différents gènes. Cependant, YAP n'a pas de domaine intrinsèque de liaison à l'ADN, et des facteurs de la transcription sont donc indispensables pour la médiation de son activité transcriptionnelle.^{59,64,65}

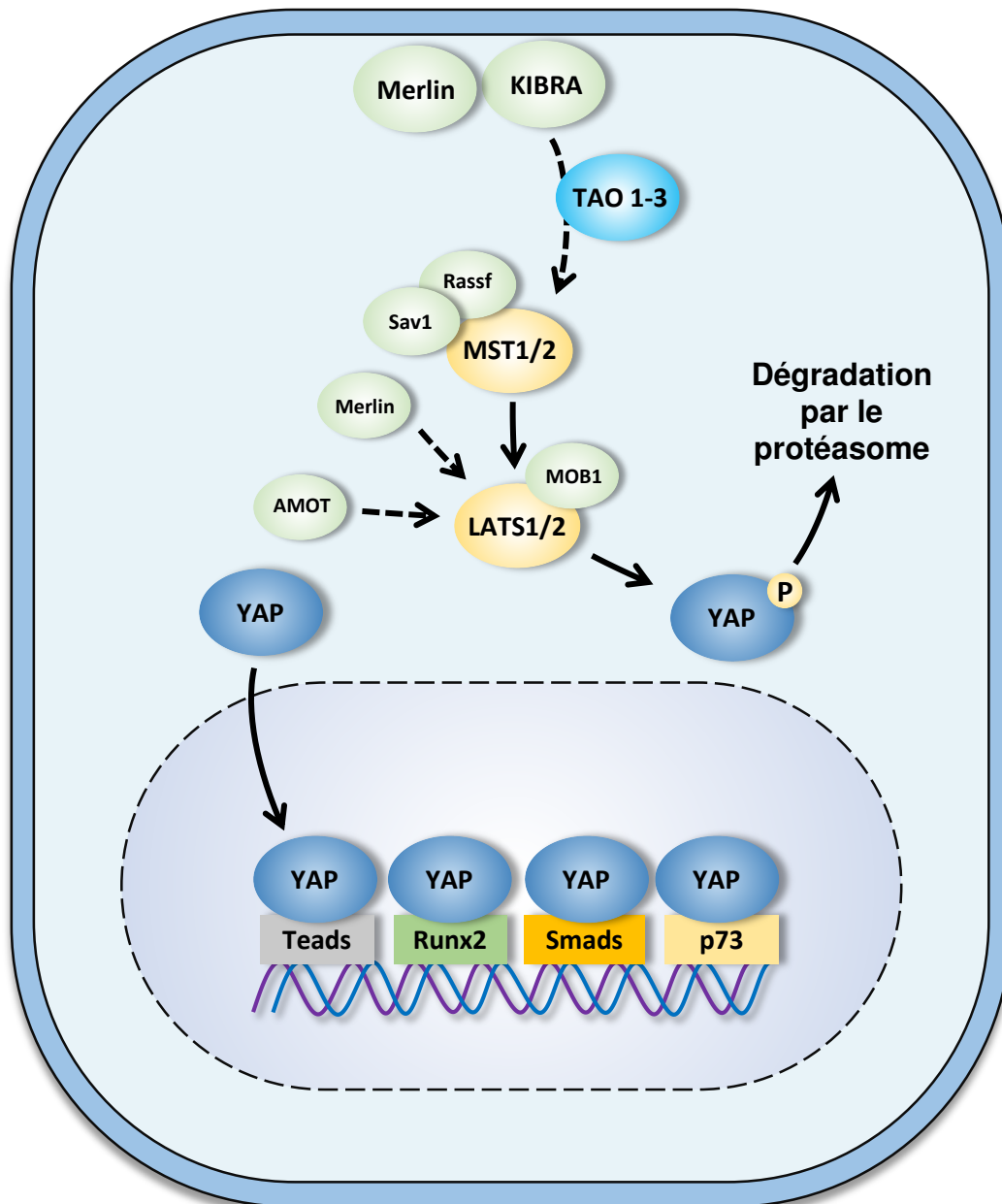


Figure 8 : Voie de signalisation Hippo chez les mammifères.

Lorsque la voie de signalisation Hippo est active, les protéines kinases MST1/2 sont phosphorylées par Merlin, KIBRA ou TAO1-3. MST1/2 activent les protéines LATS1/2 qui sont également stimulées par les protéines Sav1 et Rassf. LATS1/2 phosphoryle alors la protéine YAP qui est retenu dans le cytoplasme ou dégradé par le protéasome. Lorsque la voie de signalisation Hippo est inactive, YAP n'est pas phosphorylé et transloque au noyau où il peut exercer son activité transcriptionnelle en se liant à différents facteurs de transcription tels que Teads, Runx2, Smads ou bien p73.

C. **Machinerie transcriptionnelle de la voie hippo**

1) **Facteur de transcription TEAD, partenaire favori de YAP dans la régulation de la transcription**

Différents facteurs de transcription ont été identifiés comme partenaires de YAP, cependant, TEAD reste le principal. La protéine TEAD est un facteur de transcription conservé au cours de l'évolution, exprimé dans la plupart des tissus du corps humain. Un de ses rôles majeurs dans la biologie de la cellule est la régulation de la prolifération cellulaire et de l'inhibition de contact. Contrairement à d'autres facteurs de transcription, TEAD est connu pour être la plupart du temps lié à l'ADN, la majorité des protéines est localisée au niveau de la chromatine. De plus, TEAD ne peut exercer seul une activité transcriptionnelle, son activité repose essentiellement sur sa transactivation par des protéines co-activatrice tel que YAP, ou des protéines régulatrices telle que VGLL4. ^{59,66}

Ce sont des expériences de spectrométrie de masse menées par DePamphilis ML et son équipe⁶⁷, en 2001 puis par Song H et son équipe, en 2009⁶⁸, qui ont isolé et décrit TEAD comme partenaire de YAP pour la première fois. De nombreuses études ont suivi positionnant TEAD en intermédiaire de nombreuses fonctions biologiques liées à YAP chez les mammifères. Premièrement, lorsque la protéine TEAD est mutée sur son site d'interaction avec YAP, la surexpression de cette dernière n'entraîne plus de phénotype de croissance aberrante. De plus, une suppression constitutive de TEAD bloque les effets de la surexpression de YAP sur la croissance du foie. Une seconde étude montre qu'une perte de l'expression de TEAD entraîne des phénotypes similaires à une extinction de YAP. Enfin, l'interaction entre YAP et TEAD a été montrée dans une cohorte de patient atteint d'une maladie dégénérante de la rétine causée par une mutation sur TEAD empêchant son interaction avec YAP.

Des analyses in vitro et in vivo sur l'ensemble du génome des cibles de transcription YAP et TAZ ont été effectuées par de nombreuses équipes de recherche, ce qui a permis d'identifier leurs cibles directes, qui sont maintenant largement utilisées dans l'étude de l'activité de la voie Hippo, tels que CTGF, CYR61, ANKRD1 et bien d'autres aidant à la définition d'une signature génique de YAP. ^{51,67,69}

2) YAP en réseau avec d'autres voies de signalisation

Outre le facteur de transcription TEAD, YAP interagit avec d'autres protéines activant l'expression de nombreux gènes impliqués dans différentes fonctions biologiques tel que p73, RUNX2 ou bien Smad3.

L'interaction entre YAP et ces différents facteurs de transcription résulte d'une activité cellulaire spécifique. Par exemple, YAP peut interagir avec la protéine p73 en réponse à des dommages à l'ADN, induire l'apoptose et empêcher ainsi la formation de cellules tumorales⁷⁰⁻⁷³.

(a) P73

P73 est une protéine similaire à p53, connue pour son rôle suppresseur de tumeur. Comme p53, p73 induit l'apoptose et le blocage du cycle cellulaire.^{74,75} L'interaction entre YAP et p73 est particulièrement intéressante car YAP a un rôle pro-apoptotique dans un contexte de réparation de l'ADN endommagé. La zone d'interaction entre ces deux protéines a été identifiée au niveau du domaine WW de YAP et du motif PPPY de p73. Ce complexe YAP-P73 est essentiel à la stabilisation et au maintien de p73, et permet la coactivation de la transcription de gènes pro-apoptotiques^{76,77}. Cette chaîne d'évènement est une des principales voies « suppresseur de tumeurs » dans les cancers hématologiques. Dans ces cancers, l'expression de YAP est diminuée, empêchant la stabilisation et l'activation de p73.^{69,71,74}

(b) RUNX

Les membres de la famille des protéines RUNX sont des facteurs de transcription se liant avec l'ADN, ils sont considérés comme régulateurs majeurs du développement. Dans cette famille on retrouve notamment RUNX2 qui régule l'ostéogenèse.^{78,79} L'interaction entre YAP et RUNX2 a été identifiée la première fois par Yagi et al, et les régions d'interactions sont largement décrites. De nombreux travaux montrent que le complexe YAP/RUNX2 joue un rôle déterminant dans l'expression de gènes régulant la formation du squelette.^{69,80-82}

(c) Wnt/bcaténine

La voie de Wnt/ β caténine joue un rôle majeur dans la fibrogénèse et la carcinogénèse. Cette voie de signalisation est très active dans les cellules épithéliales et les fibroblastes, de plus elle contribue à la prolifération et à l'activité migratoire dans plusieurs organes tels que

les poumons, les reins etc... L'inhibition de la voie de signalisation Wnt par une petite molécule, l'ICG-001, reverse la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine chez la souris. Une perturbation de la signalisation médiée par Wnt est souvent retrouvée dans les cellules cancéreuses, des mutations génétiques des composants de la voie Wnt sont fréquemment observées dans de nombreux cancers. En l'absence du ligand Wnt, la β caténine, principal effecteur de la voie, est séquestrée dans un complexe cytoplasmique composé de la protéine scaffold Axin et d'autres composants tels que APC, GSK3 et CK1. Ce processus entraîne la phosphorylation et la dégradation de la β caténine par le protéasome. En présence du ligand Wnt, le complexe de destruction est dissocié, la β caténine est stabilisée, transloque au noyau où elle s'accumule. La β caténine agit en coactivateur de la transcription en se liant au facteur de transcription TCF/LEF qui lui-même active la transcription de gènes cibles.^{83,84}

Les voies de signalisation Hippo et Wnt/ β caténine sont étroitement liées, cependant les interactions entre les deux voies sont complexes et restent encore à explorer.

Une première hypothèse est posée en 2012, Rosenbluh et al suggèrent l'existence d'un complexe entre YAP-YES1 et la β caténine qui activerait la transcription en se liant au facteur de transcription TBX5. Ce complexe transcriptionnel stimulerait l'expression de gènes comme BCL2L1 et BIRC5 qui favorisent la survie des cellules tumorales. Dans cette étude, YAP n'augmente pas l'activité transcriptionnelle médiée par TCF4, le partenaire classique de la β caténine. Cependant l'inverse a été montré dans des cellules cardiaques et intestinales murines^{85,86}.

Néanmoins, les résultats d'Attisano et son équipe portent à croire que lorsque TAZ est dans le cytoplasme, la protéine régule la voie Wnt par l'inhibition de la phosphorylation de DVL par CK1 δ/ϵ , qui habituellement provoque la destruction du complexe de dégradation de la β caténine et son accumulation au noyau.⁸⁷

Azzolin et al montrent que la β caténine permet de stabiliser TAZ. Lorsque Wnt se lie à son récepteur, la β caténine active entraîne TAZ au noyau et augmente ainsi la transcription de gènes cibles.⁸⁸ Plus tard, la même équipe montre que les protéines YAP/TAZ sont des composants majeurs du complexe de dégradation de la β caténine. Dans leur hypothèse, lorsque la voie Wnt est inactive, la β caténine est séquestrée dans le complexe de dégradation avec YAP/TAZ. Le traitement avec un ligand Wnt occasionne un rapide relargage de YAP/TAZ

qui transloque au noyau et exerce son activité co-transcriptionnelle. YAP/TAZ serait donc régulé par le complexe de dégradation de la β caténine dans les cellules dont la voie Wnt est inactive, de plus ces protéines joueraient un rôle essentiel dans la dégradation de la β caténine en recrutant la protéine b-TrCP⁸⁹.

Enfin une dernière étude publiée en 2015 par Kun-Liang Guan et son équipe propose une autre hypothèse : une voie non canonique de Wnt médiée par le ligand Wnt5a active les protéines YAP/TAZ, ce qui engendre l'inhibition de la voie canonique de Wnt par la transcription de DKK1, un inhibiteur compétitif de Wnt3a⁹⁰.

Ensembles, ces résultats contradictoires suggèrent que la fonction transcriptionnelle du complexe YAP/TAZ/ β caténine n'est pas encore bien comprise et semble dépendre d'un contexte cellulaire bien spécifique et de l'interaction avec d'autres voies de signalisation.

(d) *TGF- β /smads*

Les cytokines appartenant à la superfamille du TGF- β sont des facteurs de croissance à l'origine de nombreux processus physiologiques tels que la pluripotence des cellules souches, la prolifération cellulaire mais aussi la différenciation. Chez les humains, plus de 30 membres de la superfamille du TGF- β ont été recensés, incluant les TGF- β s, les activines, les inhibines, nodal, les facteurs de croissance et de différenciation (GDFs) et les BMPs (bone morphogenetic proteins). Le TGF- β 1 est la plus abondante des isoformes des TGF- β s et est stocké dans la MEC avec des peptides LAPS et des protéines se liant au TGF- β (LTBPs). Ensemble ils forment un complexe appelé le large complexe latent (LLC). À la suite de sa libération de la MEC par différents processus protéolytiques, le TGF- β est activé, devenant mature il peut agir en activant ses récepteurs.

La propagation du signal commence quand le TGF- β se lie sur son récepteur appelé TGF- β -receptor II (TBRII), ce qui initie la phosphorylation du récepteur de type I (TBRI). TBRI est alors capable de lier et phosphoryler les protéines Smads, modulateurs centraux de la voie canonique du TGF- β .

Il existe trois classes de Smads, les Smads régulateurs : (R)-Smads (Smad2 ou Smad 3), le Smad co-activateur : (Co)-Smads (Smad4), et les Smads inhibiteurs, (I)-Smads (Smad6 ou Smad7). Les (R)-smads sont phosphorylés par TBRI et forment un complexe avec Smad4. Ce

complexe transloque vers le noyau et se lie à un motif spécifique sur l'ADN, CAGAC, appelé aussi Smad-binding éléments (SBE), et régule ainsi la transcription de nombreux gènes cibles.⁹¹

Le TGF- β est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques essentielles au développement, telles que le développement embryonnaire et l'homéostasie cellulaire. Cette cytokine est connue pour son rôle dans le remodelage osseux, affectant à la fois la formation osseuse et la résorption en agissant sur l'ostéoclastogenèse et l'ostéoblastogenèse^{1,92-94}.

Un dysfonctionnement de cette voie de signalisation conduit à de nombreuses pathologies, notamment la progression tumorale. Le rôle du TGF- β dans le cancer est bivalent et dépend du contexte dans lequel se trouve les cellules tumorales. En effet, le TGF- β peut aussi bien avoir un rôle suppresseur de tumeur dans les phases précoces du développement tumoral qu'un rôle pro tumoral dans les phases tardives^{95,96}.

Le TGF- β a la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire via le blocage du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, mais les cellules tumorales peuvent devenir résistantes à ces effets antitumoraux. Le TGF- β a alors un effet promoteur de l'EMT, de l'invasion et de la dissémination métastatique sur ces cellules.^{96,97}

Les premières évidences d'interaction fonctionnelles entre la voie du TGF- β et la voie Hippo émergent avant même la compréhension totale de la cascade de phosphorylation de la voie Hippo. Le docteur Mauviel et son équipe en 2002 ont identifié pour la première fois YAP comme un nouveau partenaire de Smad7.⁷³ Comme décrit précédemment, YAP est une protéine ayant un domaine prototypique WW pouvant se lier à un motif PPY présent chez certaines protéines, notamment chez Smad7. D'autres interactions peptidiques sont cependant nécessaires pour que YAP puisse former un complexe avec Smad7. La voie du TGF- β utilise Smad7 pour former une boucle de rétrocontrôle négative, d'une part en s'associant avec le récepteur TBRI ce qui inhibe la phosphorylation des (R)-Smads, mais aussi en recrutant des E3-ubiquitine ligases tel Smurf1 ou Smurf2 ce qui entraîne la dégradation des récepteurs au TGF- β . En interagissant avec YAP, Smad7 présente une meilleure interaction avec TBRI et potentialise son action inhibitrice.

En réponse à la signalisation médiée par le TGF- β , il a été démontré que YAP/TAZ en s'associant aux complexes Smad2/3/4 dictent leur localisation intracellulaire⁹⁸. Dans des cellules épithéliales mammaires de souris, le complexe de polarité Crumbs se lie à YAP/TAZ ce

qui favorise la phosphorylation, la localisation cytoplasmique et l'inhibition de ces protéines. Ce processus bloque donc la translocation au noyau du complexe Smad2/3. Dans l'hypothèse proposée, TAZ est une navette pour le complexe Smad3/4 régulant leur accumulation au noyau. Cependant, une autre étude indique que la plupart des types cellulaires présentent une signalisation fonctionnelle du TGF- β peu importe les conditions de culture cellulaire, à forte ou faible densité. De plus, la localisation nucléaire de Smad3 en réponse au TGF- β se produit indépendamment des niveaux de YAP ou de TAZ. Ces données suggèrent que l'inhibition de la signalisation médiée par le TGF- β via la densité cellulaire est limitée aux cellules épithéliales polarisées et reflète plutôt la distribution polarisée des récepteurs du TGF- β que les niveaux d'expression de YAP/TAZ.⁹⁹

Fujii et al ont mis en évidence une convergence entre la voie des Smads et la voie Hippo dans le contexte de la régulation transcriptionnelle de la protéine « gene encoding connective growth factor », CTGF.¹⁰⁰

De manière similaire, Hiemer et al révèlent que TEAD peut se lier à Smad2/3 dans le noyau et régule directement l'expression de gènes cible tels que NEGR1 et UCA1. Enfin, dans des cellules tumorales de mésothéliome ayant des défauts de signalisation de la voie Hippo, des complexe YAP-TEAD-SMAD-p300 se forment et induisent l'expression de différents gènes cibles. Cela a été confirmé par une autre étude dans laquelle le TGF- β stimule la formation de complexe YAP/TAZ/Smad2/3 dans des kératinocytes.¹⁰¹⁻¹⁰³

En plus de l'interaction directe entre YAP/TAZ/Smads, les régulateurs négatifs de la signalisation médiée par le TGF- β /Smad, Ski et SnoN, affectent également l'activité transcriptionnelle de YAP/TAZ en se liant directement aux principaux effecteurs de la voie Hippo. Ski se lie notamment à Lats2, Sav, NF2 et Mob et augmente l'affinité de l'interaction Lats2/Sav1 pour renforcer son activité kinase, conduisant à une augmentation de la phosphorylation de YAP/TAZ et donc à leur accumulation et à leur dégradation cytoplasmique¹⁰⁴

Pour finir, une étude menée en 2016 par O'Neill et son équipe démontre que la protéine scaffold RASSF1 en étant recrutée sur le récepteur au TGF- β TBRI en réponse au TGF- β est dégradée, occasionnant l'inactivation de la voie Hippo et donc facilite la formation et la translocation nucléaire du complexe YAP/Smads.¹⁰⁵

Toutes ces études indiquent l'existence d'interactions finement régulées entre la voie de signalisation Hippo et la voie de signalisation du TGF- β , une perturbation de l'équilibre pouvant être à l'origine de différentes pathologies.

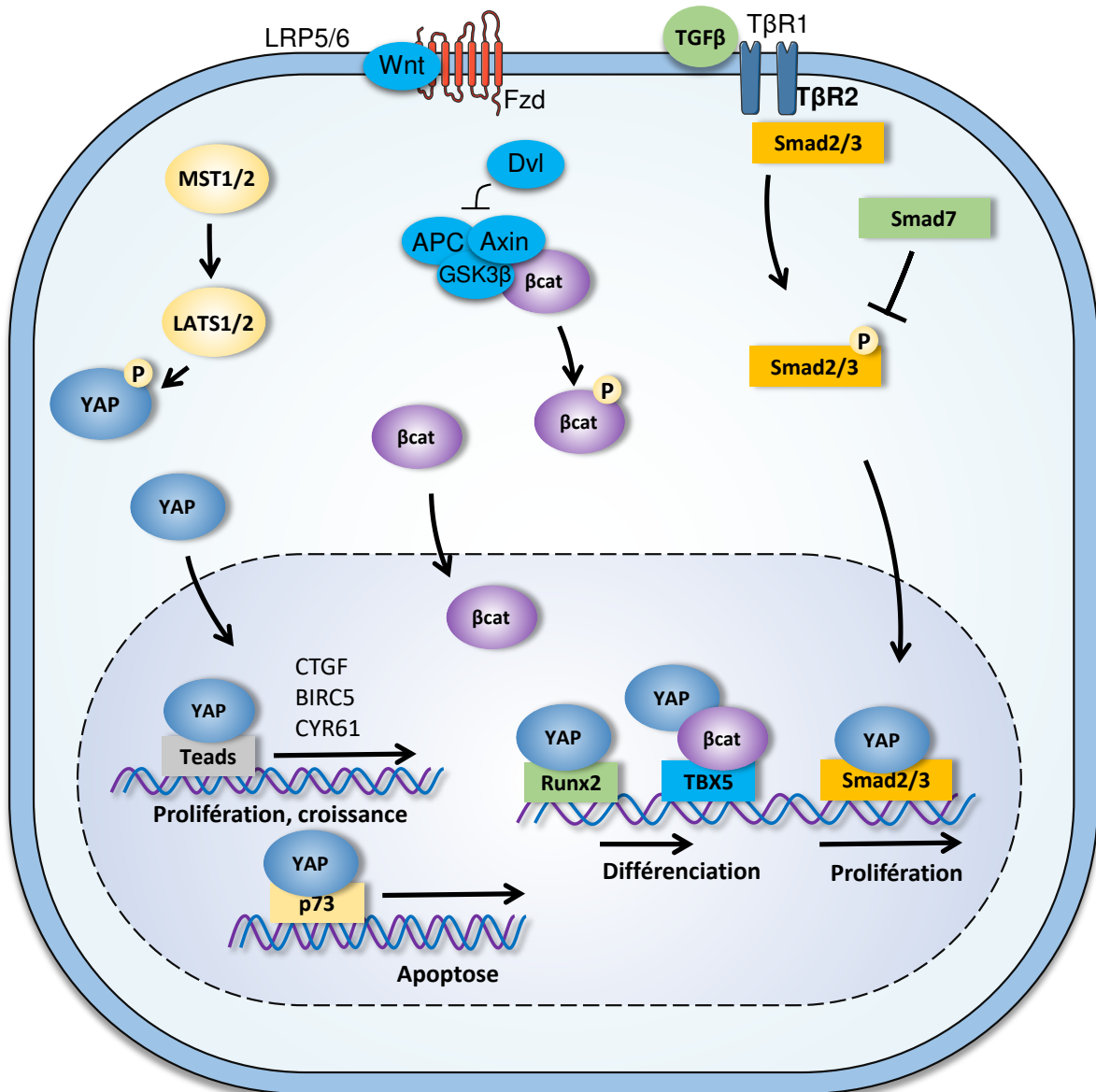


Figure 9 : Machinerie transcriptionnelle de la voie de signalisation Hippo.

Lorsque la voie de signalisation Hippo est inactive, YAP est dans le noyau et interagit avec différents facteurs de transcription. En formant un complexe avec son principal effecteur TEAD, YAP induit l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la croissance. Le complexe YAP/Runx2 et YAP/ β -caténine initie la différenciation. Le complexe YAP/Smads induit la prolifération cellulaire, tandis que le complexe YAP/P73 joue un rôle pro-apoptotique.

D. Les régulateurs de la voie Hippo

Contrairement à d'autres voie de signalisation impliquées dans le développement, telles que la voie Notch, Wnt, Hedghog ou la voie du TGF- β décrite précédemment, qui sont

activées par des ligands spécifiques, les études menées les 10 dernières années attribuent l'activation de la voie Hippo à de nombreux signaux extracellulaires ou intracellulaires. Parmi les plus étudiés, nous citerons la polarité et les jonctions cellulaires, l'action du cytosquelette et des forces mécaniques, et les signaux de stress cellulaire.

1) Polarité des cellules et jonctions cellulaires

La polarité apico-basale des cellules sépare deux domaines membranaires complémentaires : les jonctions adhérentes et les jonctions serrées. La polarité cellulaire est reliée au contrôle du développement et de la croissance tissulaire en impliquant diverses voies de signalisation.

Le domaine apical est composé de plusieurs complexes protéiques tel de Crumbs et aPKC-PAR, le domaine basal comprends le complexe SCRIBBLE. Chez les drosophiles, dans le domaine apical, Crb recrute la protéine Expanded et Merlin (NF2 chez les mammifères) et induit l'activation de la signalisation Hippo en interagissant avec TAO-1^{64,106-108}. Bien que chez les mammifères la protéine Ex soit peu exprimée, l'implication de NF2 est bien identifiée. En 2006, une étude montre que NF2 et Ex interagissent avec deux autres protéines suppresseurs de tumeur, Kibra et Pez, formant un complexe régulant la voie hippo dans le domaine apical de cellules épithéliales¹⁰⁹. Ce complexe a été décrit dans différents contextes de développement cellulaire par plusieurs équipes de recherche^{46,110,111}. Ces différentes études ont amené l'hypothèse de l'existence d'une niche subcellulaire dans le domaine apical où la voie Hippo serait très active.

Les protéines impliquées dans les jonctions cellulaires, spécifiquement les jonctions adhérentes, sont également des régulateurs de la voie Hippo. Les E-cadhérines sont à l'origine du processus d'inhibition de contact dans les cellules en culture, impliquant les protéines NF2, Kibra et LATS1/2¹¹². Les α -caténines sont également des composants majeurs des jonctions adhérentes, elles ont un rôle de liaison entre le complexe de cadhérine et le cytosquelette d'actine. En régulant négativement l'activité de YAP l' α -cadhérine a un rôle suppresseur de tumeur¹¹³. L'équipe de Silvis et al a montré que la suppression de l' α -cadhérine dans des cellules souches du follicule pileux induisait un cancer de la peau associé à une localisation nucléaire de YAP.¹¹⁴

La protéine scaffold Amot, qui se trouve au niveau des jonctions serrées, est un régulateur essentiel de la voie de signalisation Hippo. Amot possède des motifs de liaison PY/PDZ permettant l'interaction avec d'autres protéines impliquées dans la polarité cellulaire et la formation de jonctions. De plus, Zhao et al ont rapporté que ces protéines interagissent directement avec YAP/TAZ via son motif PPXY. Ces interactions régulent négativement YAP/TAZ en empêchant leur translocation nucléaire¹¹⁵. De plus, Amot peut interagir avec les protéines LATS1/2 et MST1/2 et favoriser leur activité kinase¹¹⁵⁻¹¹⁷.

Les points focaux d'adhésion régulent également la voie de signalisation Hippo via de nombreux mécanismes incluant la suppression de NF2 médiée par ILK, et l'inhibition de LATS1/2 par le complexe FAK-Src-PI3K.^{118,119}

En conclusion, le complexe de polarité apico-basale, les jonctions adhérentes et les cadhérines sont des régulateurs majeurs de la voie de signalisation Hippo et inhibent la prolifération cellulaire et la tumorigénèse.

2) Forces mécaniques et cytosquelette

Les cellules sont sujettes à différents facteurs mécaniques générés par l'élasticité de la MEC, par la force de répulsion des cellules adjacentes et par le fait que les cellules font parties d'un organe ou d'un tissu subissant lui-même des forces mécaniques.¹²⁰ Les signaux induits par les forces mécaniques sont omniprésents et font partis intégrantes de toutes les cellules du corps. De plus en plus de chercheurs s'intéressent aux effets de ces forces mécaniques appliquées aux cellules sur des fonctions biologiques telles que la prolifération cellulaire et la différenciation. De façon très intéressante, les forces mécaniques associées au cytosquelette sont un mécanisme central du contrôle de l'activité de YAP/TAZ.¹²¹

En fonction du contexte dans laquelle elle se trouve, la cellule doit faire un choix entre proliférer et se différencier. Il a été montré que lorsque la cellule peut s'étendre dans la MEC, le cytosquelette s'adapte et prend un aspect de cellules en prolifération, entraînant la formation de fibres de stress et l'activation de YAP/TAZ. Les effecteurs de la voie Hippo s'accumulent au noyau et permettent la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération. Au contraire, quand la cellule est dans un espace restreint, YAP/TAZ sont séquestrés dans le cytoplasme, et les cellules s'arrêtent de proliférer et initient le processus de différenciation.¹²²⁻¹²⁵

Les protéines YAP/TAZ répondent également à la modification de rigidité de la MEC. Une MEC rigide est associée à l'activation de YAP/TAZ au noyau, tandis qu'une matrice plus souple est plutôt associée à la séquestration cytoplasmique de ces protéines^{123,126,127}.

Pour donner un exemple fonctionnel, les MSC peuvent se différencier en types cellulaires différents en fonction de la rigidité de la MEC. Une forte rigidité, et donc une localisation nucléaire de YAP/TAZ, favorise la différenciation ostéoblastique, tandis que les tissus mous favorisent la différenciation en d'autres types cellulaires tels que les adipocytes.

128

3) Facteurs solubles

La croissance des tissus nécessite des nutriments ainsi que des signaux hormonaux de nature autocrine, paracrine et endocrine. On a donc longtemps imaginé que des molécules extracellulaires tel que des hormones ou des facteurs de croissance pouvaient réguler la voie de signalisation Hippo.

Une série d'études ont montré l'implication des récepteurs aux protéines G (GPCRs) et leurs agonistes dans la régulation de la voie de signalisation Hippo¹²⁹. Des molécules extracellulaires telles que l'acide lysophosphatidique (LPA) et la sphingosine-1-phosphate (S1P) activent et stabilisent YAP/TAZ via leurs récepteurs respectifs LPAR et S1PR. De manière intéressante, les différentes protéines G ont des effets opposés sur la régulation de l'activité Hippo, les protéines Ga11, Ga12, Ga13, Gai, Gap et Gaq sont des protéines activatrices, tandis que les protéines G α s inhibent l'activité de YAP/TAZ. La GTPase Rho est activée par des protéines Ga12/13 et Gaq/11, entraînant la polymérisation de l'actine ce qui dérégule l'activité kinase de LATS1/2, tandis que la protéine Gas augmente son activité¹³⁰. Une forte expression de GPCRs ou bien des mutations des protéines G α entraînent une activation anormale de YAP associée à de nombreuses pathologies^{102,131-133}.

4) Signaux de stress cellulaires

Les premières fonctions biologiques de la voie Hippo mises en évidence sont la régulation de la prolifération, la survie, et la différenciation cellulaire, par conséquent de nombreux signaux de stress peuvent moduler l'activité YAP/TAZ. Cependant, ce n'est que très récemment que l'on a caractérisé ces signaux de stress comprenant entre autres le stress oxydatif, l'hypoxie et le stress de déficit énergétique.

L'homéostasie énergétique d'une cellule est maintenue grâce au ratio AMP/ATP qui peut réguler l'activité d'une kinase, l'AMP-activated protein kinase (AMPK). L'AMPK phosphoryle la protéine AMOTL qui à son tour active la kinase LATS1/2, elle peut également phosphoryler directement YAP et l'empêcher d'exercer son activité transcriptionnelle¹³⁴⁻¹³⁶.

L'hypoxie semble activer YAP/TAZ via le recrutement de l'E3 ubiquitine ligase qui empêche LATS1/2 d'exercer son activité kinase.¹³⁷

Enfin, le stress oxydatif a rôle bivalent : d'un côté les kinases MST1/2 sont activées par le peroxyde d'hydrogène et donc inhibe l'activité de YAP/TAZ, et d'un autre côté, YAP peut interagir directement avec le facteur de transcription FOXO1 et activer la transcription de différents gènes réduisant le stress oxydatif tel que la catalase¹³⁸.

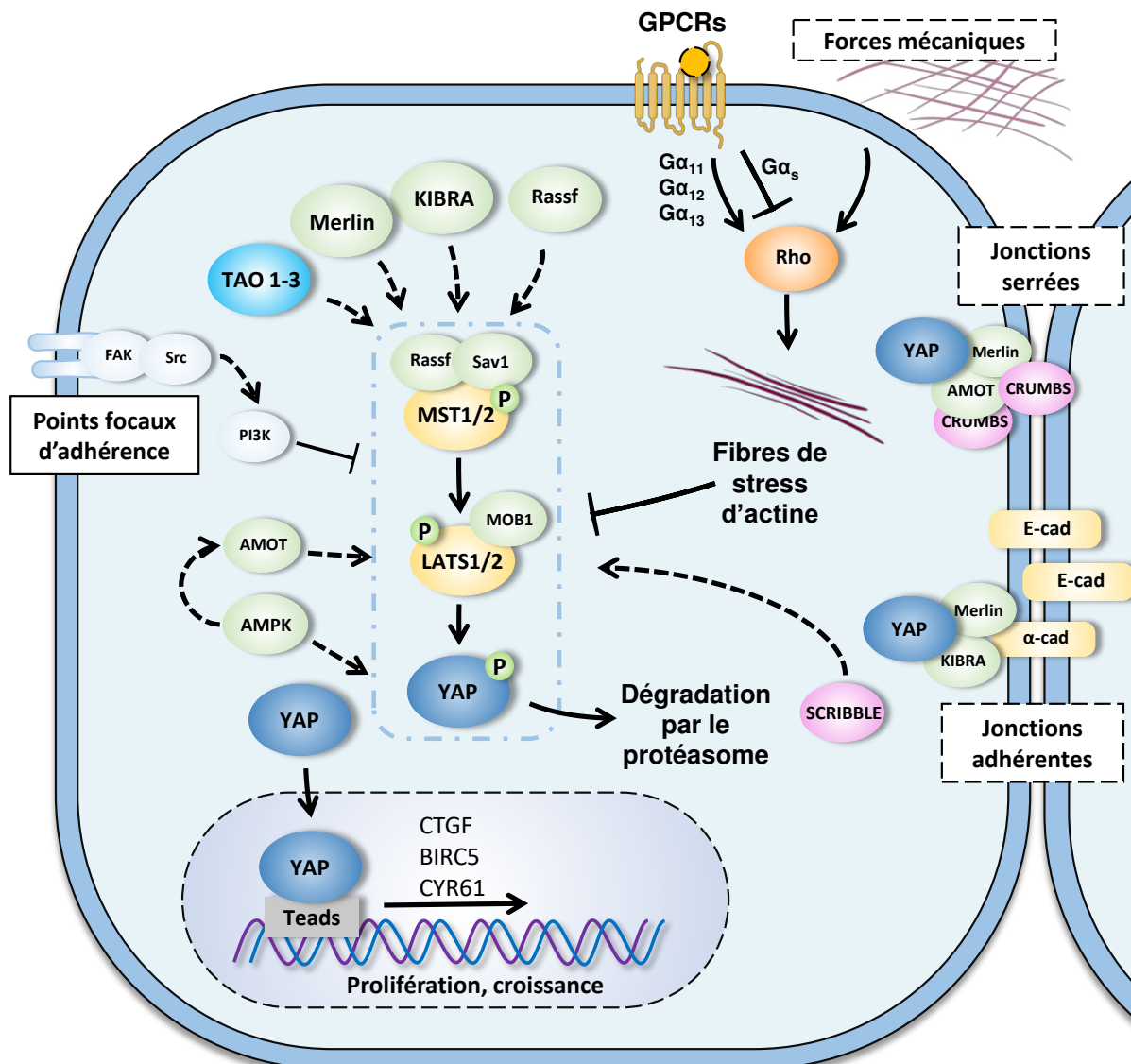


Figure 10 : Mécanismes régulateurs de la voie de signalisation Hippo.

La polarité apico-basale, les forces mécaniques, les facteurs solubles et les signaux de stress peuvent réguler l'activité transcriptionnelle de la voie de signalisation Hippo.

E. Implication de la voie Hippo dans le développement

La voie de signalisation Hippo a d'abord été décrite pour son implication dans le contrôle de la taille des organes chez la drosophile, puis, suite aux nombreuses études menées ces dernières années, sa fonction a été étendue à d'autres processus biologiques indispensables au développement.

1) Développement embryonnaire

Les premières études de KO YAP chez des souris ont dévoilé son rôle majeur dans le développement embryonnaire, particulièrement à un stade précoce. Les embryons de souris KO YAP meurent 8,5 jours après implantation, ils sont caractérisés par une petite taille, des défauts de morphogénèse neurale, de vascularisation et d'autres malformations^{54,139}.

Chez les mammifères, la première étape du développement embryonnaire est la formation du trophoctoderme (TE) et de la masse cellulaire interne (ICM) lors la phase de préimplantation de l'embryon. Le TE est composé des cellules externes du blastocyte et est à l'origine des cellules extra-embryonnaires, tandis que l'ICM est à l'origine de l'embryon lui-même. La polarité cellulaire est essentielle à la formation du TE et de l'ICM, les cellules apolaires formant l'ICM tandis que les cellules polaires forment le TE. Dès le stade de 16 cellules, YAP/TAZ a une localisation subcellulaire différente entre les cellules polaires et apolaires, ce qui entraîne une signature génique différente entre le TE et l'ICM comme le gène *Cdx2* plus exprimé dans le TE⁵⁴. Ces résultats sont confirmés par des souris KO TEAD pour lesquelles les embryons sont incapables de former le TE¹⁴⁰⁻¹⁴³.

2) Contrôle de la taille des organes

Le contrôle de la taille des organes est la fonction biologique la plus connue de la voie de signalisation Hippo. Chez la drosophile, des mutations sur les kinases composant la voie Hippo engendrent des organes de taille aberrante, tels que les yeux et les ailes. Les effets de la voie Hippo sur le contrôle de la taille des organes sont très conservés chez les mammifères et sont décrits dans de nombreuses études chez la souris. Pour citer un exemple, la surexpression d'une protéine YAP inductible dans le foie de souris peut engendrer une croissance anormale de l'organe, qui retourne à un état normal après l'arrêt de l'induction^{53,144,145}.

Cependant, tous les organes n'ont pas la même sensibilité à l'activité de la voie Hippo. L'inhibition de la kinase Mst1/2 entraîne une prolifération aberrante de certains organes tels que le foie, le cœur, l'estomac et la rate mais pas dans les reins ni les poumons. Un KO de YAP dans le foie d'une souris entraîne un défaut de production de bile mais pas de défaut de

croissance de l'organe. De plus, un défaut d'expression de YAP dans le des tissus mammaires ou intestinaux n'ont pas de conséquence sur la taille ou la structure des organes^{146,147}.

Les signaux physiologiques en amont de la voie Hippo impliqués dans la régulation de la taille des organes ne sont pas encore tous identifiés. Cependant les forces mécaniques et les tensions peuvent être modifiées lors de la croissance d'un organe et inhiber l'activité de YAP/TAZ, notamment lorsque l'organe a atteint sa taille finale.

3) Régénération tissulaire

L'activité de YAP/TAZ a également un rôle dans la régénération tissulaire. Les premières études menées chez les mammifères ont montré l'implication de YAP/TAZ dans la régénération du foie après une ablation : les hépatocytes ont une capacité de régénération très rapide, lors de ce processus l'activité de YAP est nécessaire¹⁴⁸⁻¹⁵¹. YAP a été ensuite décrit dans les processus de régénération d'autres tissus tels que le tissu cardiaque ou mammaire¹⁵²⁻¹⁵⁴.

4) Remodelage osseux

De plus en plus de preuves soulignent l'importance de la voie Hippo dans le maintien de la balance entre l'ostéoblastogenèse et l'ostéoclastogenèse pendant le processus de remodelage osseux. Les ostéoclastes et ostéoblastes sont régulés par différentes voies de signalisation notamment la voie Wnt/ β -caténine, NF-kB et la voie du TGF- β ⁴.

En 2015, une étude publiée par Lee et son équipe affirme que MST2 affecte le développement des ostéoclastes et ostéoblastes via l'interaction de la voie Hippo avec d'autres voie de signalisation¹⁵⁵. Après avoir éteint l'expression de MST2 chez des souris, ils observent des défauts de développement osseux, menant à l'hypothèse que MST2 régule la maturation des ostéoclastes via son interaction avec la voie NF-kB. En effet le ligand au récepteur de la voie NF-kB (RANKL), est indispensable au développement des ostéoclastes. Il active le facteur de transcription NFATC1 et induit l'expression de gènes cibles pro-ostéoclastes tels que Oscar et Acp5. MST2 intervient en inhibant l'activité de RANKL ce qui régule la balance formation osseuse/destruction osseuse. MST2 est également impliqué dans l'ostéoblastogenèse en induisant l'expression de RUNX2 qui lui-même active la transcription de gènes pro-ostéoblastes¹⁵⁵. Dans une étude publiée récemment, l'expression de RUNX2 dans les ostéoblastes serait dépendant de Glut-1, suggérant un rôle majeur du glucose dans

la régulation du remodelage osseux par MST1/2. YAP1 module l'ossification pendant le remodelage osseux via son implication dans la différenciation des chondrocytes. SOX6 qui est un facteur de transcription essentiel dans la chondrogenèse est un gène cible du complexe YAP1/TEAD¹⁵⁶.

Comme décrit précédemment, la voie Hippo est étroitement liée avec la voie Wnt/ β caténine très connue pour son rôle majeur dans la régulation du remodelage osseux. L'activité de YAP1 serait capable de moduler la signalisation médiée par Wnt dans le cadre de la différenciation chondrocytaire¹⁵⁷.

Enfin, en 2016 Tang et al suggèrent l'importance des protéines Snail et Slug dans le maintien de l'homéostasie osseuse en formant un complexe avec YAP/TAZ. Lors de l'ostéogenèse, un complexe composé de YAP/TAZ, Slug et Snail se forme dans les cellules stromales et les progéniteurs osseux empêchant la phosphorylation de YAP/TAZ. De plus, Snail et slug pourraient favoriser l'interaction de TAZ avec RUNX2 pour stimuler l'expression de gènes cibles tels que OSX, OCN et COL1A 1 favorisant l'ostéogenèse.¹⁵⁸

F. Pathologies associées à la voie Hippo

1) Fibrose

Lorsque les organes subissent des lésions de façon répétée, les mécanismes de réparation des tissus peuvent conduire à un dysfonctionnement des cellules environnantes. Les cellules épithéliales sécrètent de nombreuses cytokines, chimiokines et facteurs de croissance pouvant induire l'accumulation de fibroblastes qui deviennent alors des myofibroblastes. La fibrose est une lésion dans organe ou un tissu, caractérisée par la production anormale de MEC par des myofibroblastes. Ces cellules produisent essentiellement des collagènes de types I et III mais également de la fibronectine et des laminines. L'équilibre entre la production et la destruction de la matrice est assurée par d'autres protéines telles que les métalloprotéases qui détruisent les composants de la MEC. Lorsque l'équilibre entre destruction et formation de la MEC est perturbé, des lésions de fibrose apparaissent. De nombreux organes peuvent être touchés par cette pathologie, notamment le cœur et les reins pour lesquels la fibrose peut être à l'origine de maladie chronique qu'aucune thérapie ne peut actuellement guérir^{159,160}.

La différenciation des myofibroblastes est initiée par des facteurs de croissances extracellulaires, les effecteurs des voies de signalisation du TGF- β et Wnt/ β caténine sont particulièrement impliqués dans leur différenciation. Les facteurs de croissance sont piégés dans la MEC jusqu'à leur libération et peuvent alors se fixer aux récepteurs des cellules induisant des signaux biochimiques décrits précédemment. ¹⁶¹

Dans le passé les voies de signalisation étaient souvent isolées et étudiées selon le même schéma : un ligand se fixe à son récepteur et induit une cascade phosphorylation permettant la transcription de gènes cibles. Toutefois depuis quelques années cette vision de la biologie cellulaire a changé, les cascades de phosphorylation sont plutôt organisées en réseaux complexes pouvant être à l'origine de pathologies telles que la fibrose. Différentes approches moléculaires associées à des études *in vivo* ont permis d'établir un lien entre la voie de signalisation Hippo avec la voie du TGF- β et la voie Wnt dans la fibrose^{160,162,163}.

Dans l'exemple de la fibrose pulmonaire, qui est une maladie chronique de mauvais pronostic, l'excès de MEC et la contraction des fibroblastes contribuent à diminuer la capacité respiratoire. Liu et son équipe ont montré que chez ces patients, YAP est fortement exprimé dans les fibroblastes. En conclusion à différentes expériences *in vitro* et *in vivo*, l'hypothèse d'une boucle d'activation entre YAP/TAZ et la MEC est proposée¹⁰². Le complexe agit comme un capteur de rigidité de la MEC, plus celle-ci est rigide plus YAP/TAZ est activé dans les fibroblastes. En coopérant avec la voie du TGF β , YAP/TAZ stimule la production de facteurs pro-fibrogéniques tels que CTGF et PAI-1. ^{84,162}

2) Cancer

Compte tenu du rôle essentiel de la voie Hippo dans la régulation de la taille des organes et du développement, il n'est pas surprenant que des dysfonctionnements impliquant cette voie de signalisation conduisent à la formation de cellules cancéreuses.

Ces dix dernières années, un certain nombre de publications ont montré l'implication de YAP/TAZ dans la carcinogénèse et la croissance tumorale. Les tumeurs pourraient se servir des propriétés biologiques de YAP/TAZ pour favoriser leur propre prolifération, migration, et formation de tumeurs secondaires. Des analyses immunohistochimiques de nombreux cancers humains suggèrent une augmentation de l'activité YAP/TAZ en comparaison avec les tissus sains. Des méta-analyses combinant plus de 20 études sur plus de 9000 tumeurs

montrent une amplification de YAP/TAZ notamment dans les cancers des ovaires, de la tête et de la nuque. Les cancers gastro-intestinaux et gynécologiques sont plus souvent associés à des mutations sur les kinases inhibitrices LATS1/2 et sur NF2. ^{44,163,164}

La surexpression de YAP, associée à un niveau élevé de TEAD, est corrélée à un mauvais pronostic et augmente les risques de résistances aux chimiothérapies dans différents cancers¹⁶⁵. Cependant, les mécanismes à l'origine des amplifications de YAP/TAZ ou bien TEAD ne sont pas encore connus. Des études récentes suggèrent la coopération entre la voie Hippo et d'autres facteurs tels que le remodelage de la chromatine ou bien d'autre voie de signalisation. Saladi, S.V. et al. en 2017 démontrent que l'amplification de ACTL6A et p63 augmente l'expression de YAP. Comme expliqué précédemment, d'autres voies de signalisation agissent en réseau avec la voie de Hippo. Leur implication dans le développement de tumeurs est souvent associée à l'inhibition des kinases inhibitrices de YAP/TAZ, notamment PI3K qui inhibe LATS1/2, facteur de mauvais pronostic. La dérégulation et plus spécifiquement la perte des régulateurs en amont de la voie Hippo peut être à l'origine de la translocation nucléaire de YAP et favoriser la prolifération des cellules tumorales. La localisation nucléaire de YAP est fortement associée à des mutations du suppresseur de tumeur NF2 dans les cancers du système nerveux. De plus, des altérations génétiques et des méthylations sur les suppresseurs de tumeurs LATS1/2 ont été observées dans différents cancers^{166,167}. Plus rarement la dérégulation de la voie Hippo passe par la formation de protéine de fusion aberrante, notamment la protéine de fusion TAZ-CAMTA1 retrouvée dans 90% du cancer vasculaire. Cette protéine de fusion est constitutivement active et n'est pas régulée par les composants de la voie Hippo. ¹⁶⁸

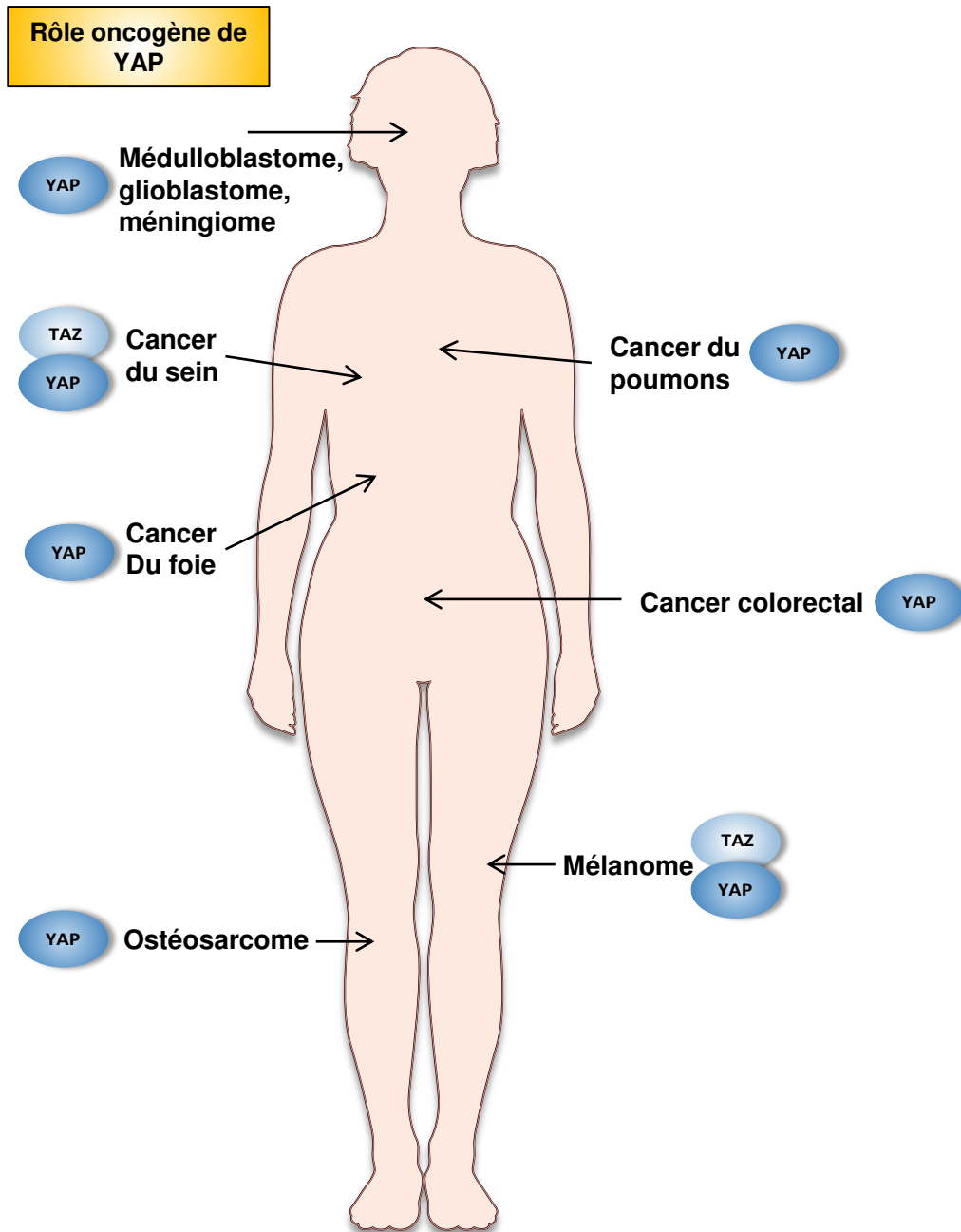


Figure 11 : La voie de signalisation Hippo a un rôle oncogène dans différents cancers

(a) *Initiation et croissance de la tumeur*

La voie de signalisation Hippo a été définie à l'origine comme une voie de régulation de la prolifération des cellules et de la taille des organes, puis de nombreuses études ont montré son implication dans le développement de cancers. Ces études ont notamment décrit le rôle du facteur de transcription TEAD dans la progression de plusieurs tumeurs solides, en interaction ou non avec YAP. TEAD entraîne la transcription de gènes cibles connus pour être impliqués dans la prolifération cellulaire et le maintien de l'homéostasie tissulaire. Parmi ces gènes, on retrouve en plus CYR61 et CTGF, les gènes Wnt5A, DKK1, TGFB2, MYC et d'autres. TEAD ne présente pas d'activité transcriptionnelle sans partenaire, il a besoin d'un coactivateur, le principal étant YAP. En interagissant ensemble, le complexe YAP/TEAD entraîne l'expression des gènes cités précédemment, impliqués dans la prolifération cellulaire et anti-apoptotiques¹⁶⁹.

(b) *Angiogenèse*

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'une vascularisation préexistante.

L'angiogenèse est un processus très régulé au cours du développement, ce n'est pas surprenant qu'un déséquilibre dans la formation de nouveaux vaisseaux soit à l'origine de pathologies, notamment le cancer. De nombreux exemples montrent la dépendance de la croissance de la tumeur primaire et de la formation de métastases à la néovascularisation : habituellement lorsqu'une tumeur atteint une taille d'environ 2 mm de diamètre elle ne peut plus croître sans nutriments apportés par la néovascularisation. En plus d'être indispensable à la croissance tumorale, les vaisseaux sanguins permettent aux cellules tumorales de métastaser loin de la tumeur primaire. Les cellules tumorales qui atteignent la circulation sanguine, migrent et prennent niche dans d'autres organes et à leur tour induisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. De nombreuses études suggèrent que l'angiogenèse tumorale est induite quand la croissance de la tumeur primaire cause un déséquilibre dans le ratio des molécules pro- et anti-angiogéniques. L'augmentation de la taille de la tumeur primaire réduit les échanges d'oxygène entre les cellules tumorales et le sang, contribuant à l'activation des voies d'hypoxie. L'expression de HIF est augmentée, ce qui a comme conséquence la surexpression des molécules pro-angiogéniques VEGF, FGF et MMPs.¹⁷⁰⁻¹⁷² De plus, d'autres études ont montré un rôle majeur des voies de signalisation

oncogènes PI3K et MAPK dans l'angiogenèse en contribuant à la surexpression de ces molécules pro-angiogéniques¹⁷²⁻¹⁷⁴.

De nombreuses voies de signalisations régulent l'angiogenèse, mais le facteur de croissance VEGF-A est le facteur pro-angiogénique le plus connu. Habituellement VEGF-A active des voies de signalisation liées à l'angiogenèse, par exemple en augmentant la sécrétion de MMPS ou bien de facteurs augmentant la prolifération des cellules endothéliales. Il semble que les signaux en amont des facteurs pro-angiogéniques sont redondants à d'autres voies de signalisation telles que FGFR ou PDGFR qui ont les mêmes effets que VEGF-A. Les cellules endothéliales sont sensibles à deux principaux facteurs : hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), qui est exprimé quand le niveau d'oxygène est très bas, et les MMPs qui sont à l'origine de la dégradation de la matrice extracellulaire et du relargage de nombreux facteurs de croissance ayant un impact sur la migration des cellules endothéliales. Lors des phases précoces de l'angiogenèse, les cellules endothéliales perdent leurs jonctions avec les cellules adjacentes et modifient leur forme pour augmenter leur motilité. En 2000, Glienke et al ont mis en évidence la propriété des cellules endothéliales à former des néovaisseaux dans du matrigel en culture¹⁷⁵. En comparant ces cellules endothéliales sous forme de tube à des cellules endothéliales naïves, ils ont montré l'importance de différents régulateurs, notamment les protéines CTGF, CYR61 et AMOT2, connues pour être des cibles transcriptionnelle de YAP. D'autres équipes de recherche ont donc continué à étudier les rôles de la voie Hippo dans l'angiogenèse, en commençant par les protéines membres de la famille AMOT : AMOT, AMOTL1, AMOTL2. Ce sont des protéines localisées à la membrane des cellules régulant la motilité des cellules endothéliales, et connues pour interagir avec YAP. C'est également une cible transcriptionnelle du complexe YAP/TEAD.^{115,176-179}

L'imperméabilité et l'intégrité des vaisseaux sanguins sont également des facteurs régulés lors de l'angiogenèse, notamment grâce au marqueur CD44 présent à la surface des cellules endothéliales¹⁸⁰. CD44 peut réguler le niveau d'expression et l'activité des MMPs. Une étude associe le marqueur CD44 à la protéine NF2, un régulateur de la voie Hippo décrit précédemment, cependant les conséquences des interactions CD44-Hippo sur les effecteurs YAP/TAZ ne sont pas encore totalement compris.¹⁸¹

Le microenvironnement des cellules endothéliales est un élément essentiel à leur régulation, notamment via les propriétés physiques de la MEC. La rigidité de la matrice entraîne en condition normale la localisation cytoplasmique de YAP. Les cellules endothéliales sont sensibles à la modification de rigidité de la MEC : l'équipe de Mochizuki en 2017 a utilisé une nouvelle technique de micropatterning permettant de cultiver des cellules endothéliales tout en les soumettant à une certaine morphologie. Lorsque les cellules sont dans un espace restreint, YAP a une localisation cytoplasmique, tandis que lorsque les cellules sont étirées, YAP est nucléaire et entraîne la prolifération des cellules endothéliales. ^{123,182}

L'angiogenèse est régulée par de multiples voies de signalisation, la principale étant le système VEGF/VEGFR. Cependant, le TGF- β régule la prolifération, la différenciation et la migration des cellules endothéliales, notamment les TGF- β 1, 2 et 3. ¹⁸³⁻¹⁸⁵ Ces cytokines activent la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse via son facteur de transcription Smad3. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* montrent l'importance du TGF- β dans la formation de vaisseaux. La protéine scaffold RASS1FA serait impliquée dans la régulation des interactions entre YAP et Smad induites par le TGF- β . Les chercheurs montrent que lorsque RASS1FA est dégradée, l'activation de Smad en réponse au TGF- β provoque une translocation nucléaire de YAP/Smad^{105,186}.

(c) *Dissémination métastatique*

La dissémination métastatique est définie par la migration de cellules tumorales venant d'un tissu primaire à des sites secondaires plus ou moins éloignés. La dissémination métastatique représente un point critique dans le traitement du cancer et est associée à un mauvais pronostic vital. Pour être capable de métastaser, les cellules tumorales doivent acquérir de nouvelles capacités leur permettant d'accomplir une série d'étapes : les cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire, envahissent le tissu environnant et entrent dans la circulation sanguine ou lymphatique (intravasation). Elles doivent alors s'échapper du système immunitaire pour survivre en suspension dans la circulation sanguine, puis s'arrêtent à un organe distant de la tumeur primaire. Elles quittent alors la circulation sanguine par un mécanisme d'extravasation et développent de nouvelles capacités à survivre dans un tissu différent de la tumeur primaire.¹²⁶

Plusieurs études ont mis en avant l'implication de la voie Hippo dans le développement de différents cancers, c'est donc naturellement que des chercheurs ont étudié son implication

dans la formation de métastases. Une série d'études menées depuis une dizaine d'année ont mis en évidence l'importance de YAP dans différents mécanismes moléculaires associés à la dissémination métastatique.

Lors des phases tardives de la tumorigénèse, les cellules tumorales subissent des changements sous l'action du microenvironnement et engendrent un processus de **transition épithéliaux-mésenchymateuse** (EMT). L'EMT est un processus essentiel à la dissémination métastatique grâce auquel les cellules épithéliales perdent leur polarité, perdent leur jonction inter-cellulaire, augmentent leur motilité et leur capacité à envahir pour avoir toutes les caractéristiques de cellules mésenchymateuses. L'EMT permet aux tumeurs de métastaser en leur procurant des propriétés invasives. Ces événements sont initiés par l'inhibition de la E-Cadhérine, la dérégulation de la voie de signalisation tels que la voie Wnt et la voie du TGF- β , suivis de l'expression de protéines telles que la vimentine, la fibronectine et des facteurs de transcription comme Snail, Slug et Twist. La perte de la E-cadhérine est associée à l'activité du TGF- β dans plusieurs cancers, mais de manière intéressante plusieurs études montrent que d'autres voies de signalisations coopèrent avec la voie du TGF- β tels que Wnt, Sonic hedgehog ou la voie de signalisation Hippo. L'EMT est un processus réversible, les cellules tumorales sont capables de retrouver un phénotype épithélial plus adapté à la prolifération^{187,188}.

De nombreux facteurs sécrétés dans le microenvironnement tumoral sont indispensables à la mise en place de l'EMT, on retrouve le Fibroblast growth factor (FGF) et hepatocyte growth factor (HGF). Les cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral sont aussi essentielles à l'EMT, notamment le TGF- β . Son rôle dans l'EMT est largement décrit dans la littérature. Les effecteurs du TGF- β , les protéines Smads, stimulent l'expression de facteurs de transcriptions comme SNAIL, ZEB et TWIST indispensable à l'EMT, mais aussi les métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 qui favorisent la migration et l'invasion cellulaire. Le TGF- β initie également ce processus de manière indépendante des SMADS, via le remodelage du cytosquelette ce qui active ERK. De façon intéressante, d'autres voies de signalisation travaillent en réseau avec la voie du TGF- β pour réguler l'EMT, telles que la voie Wnt, la voie Sonic Hedgehog ou la voie Hippo.^{189,190}

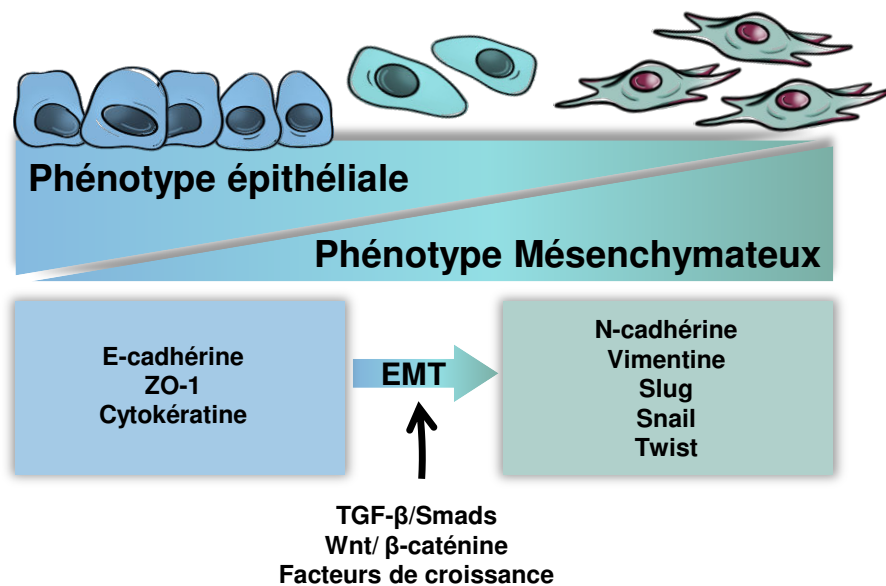


Figure 12 : Transition épithéliaux-mésenchymateuse (EMT).

En réponse à différents facteurs extracellulaires les cellules épithéliales perdent progressivement leurs marqueurs épithéliaux tels que la E-cadhérine pour exprimer des marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine. Les cellules changent de morphologie pour adopter un profil allongé pro-migratoire.

Les effecteurs des différentes voies de signalisation coopèrent dans le noyau des cellules tumorales pour réguler l'expression de facteurs indispensables à l'EMT. La voie de signalisation Wnt induit l'expression de gènes contribuant à l'EMT via la β -caténine et son facteur de transcription TCF/LEF mais aussi en coopérant avec les protéines SMADs. Par exemple, dans les cellules épithéliales pulmonaires, la β -caténine est nécessaire à l'EMT induite par le TGF- β et contrôle l'expression de α -SMA en interagissant avec Smad3¹⁹¹⁻¹⁹³. La voie du TGF- β stimule également la formation des complexes β -caténine/LEF1, ce qui augmente l'expression des facteurs de transcription SNAIL1 et SNAIL2.

La plupart des sarcomes ont un phénotype clinique agressif, caractérisé par la présence de métastases lors du diagnostic, associé à de nombreuses rechutes et un mauvais pronostic vital. Les cellules tumorales sont d'origine mésenchymateuse et ont déjà les caractéristiques phénotypiques induites par l'EMT chez les cellules épithéliales et n'ont pas cette étape à franchir. Cependant, différentes études ont montré que l'EMT est un processus graduel composé d'étapes intermédiaires, les cellules tumorales de sarcome peuvent subir des changements phénotypiques similaires à l'EMT¹⁸⁷. Toutefois, étant des cellules d'origine mésenchymateuses elles ne vont pas subir le processus inverse et acquérir des phénotypes

épithéliaux, mais elles peuvent revenir à leur phénotype initial afin de moduler leurs capacités à migrer ou proliférer. Dans les sarcomes, ce processus est appelé EMT-like, et a été décrit notamment dans l'ostéosarcome. Les cellules tumorales d'ostéosarcome ont un niveau d'expression de Twist plus élevé que dans un tissu sain, de plus un ostéosarcome métastatique de haut grade montre une augmentation de l'expression de Twist comparé un ostéosarcome non métastatique.¹⁹⁴ D'autres facteurs de transcription indispensables à l'EMT comme Snail-2 sont également exprimés dans l'ostéosarcome, et corrélés à une tumeur de haut grade. Le rôle du TGF- β n'est pas totalement élucidé dans le processus d'« EMT-like », cependant plusieurs études montrent la capacité du TGF- β à induire la migration dans l'ostéosarcome. De plus, son inhibition à l'aide de SD-208 bloque sa capacité à stimuler la migration et l'invasion dans l'ostéosarcome^{190,195,196}.

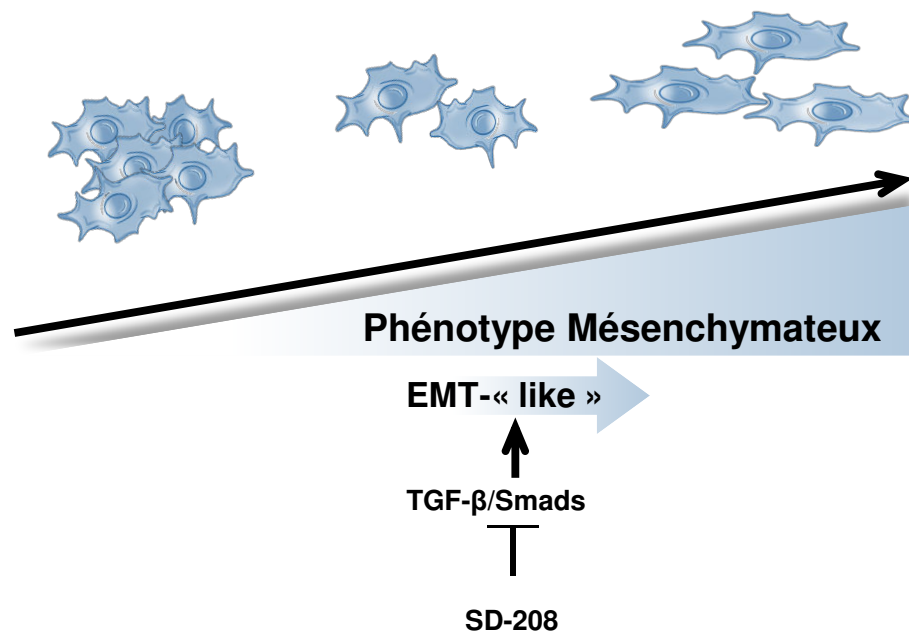


Figure 13 : EMT- « like »

Les cellules tumorales d'ostéosarcomes subissent un changement morphologique associé à l'expression de gènes mésoenchymateux pour migrer et métastaser, en réponse au TGF- β .

Peu d'études expliquent comment YAP induit l'EMT, toutefois Li et al. ont montré que la surexpression de TAZ dans des cellules épithéliales mammaires induit l'expression de SOX2 et initie l'EMT¹⁹⁷. En 2006, Overholzer et al ont montré que la surexpression de YAP dans des cellules épithéliales mammaires entraînaient un changement de conformation des cellules associé à un profil d'expression lié à l'EMT¹⁹⁸. Cette publication a été suivie par d'autres recherches similaires ayant les mêmes conclusions dans des cellules de cholangiocarcinome,

des cellules mammaires murines, des cellules de cancer du pancréas et d'autres types de cancers¹⁹⁹. TAZ entraîne la surexpression de facteurs de transcriptions essentielles à l'EMT, tels que Snail, Slug, Twist et ZEB1 et FOX2, associée à l'augmentation de l'expression de la vimentine, des N-Cadhérines, et des MMPs¹⁹⁹. De plus, ZEB1 peut interagir directement avec YAP pour réguler l'expression de gènes cibles impliqués dans l'EMT, associés à un mauvais pronostic vital et un risque de rechute élevé¹. De façon similaire, Snail et Slug forment un complexe avec YAP pour réguler la différenciation et la division de cellules souches squelettiques¹⁵⁸. KRAS stimule l'activité transcriptionnelle de YAP médiée par FOS dans un modèle murin de cancer du poumon, et active l'expression de gènes impliqués dans le processus d'EMT²⁰⁰. Enfin, une étude très récente propose un mécanisme par lequel YAP peut contrôler l'EMT : d'abord en supprimant l'expression de E-cadhérine via un mécanisme dépendant de WT1, puis en augmentant l'activité de Rac1 qui active la migration.²⁰¹ Il est important de noter que l'expression et l'activité de YAP sont elles-mêmes régulées par l'EMT, on peut alors penser à l'existence d'une boucle de rétrocontrôle entre l'EMT et l'activité de YAP.

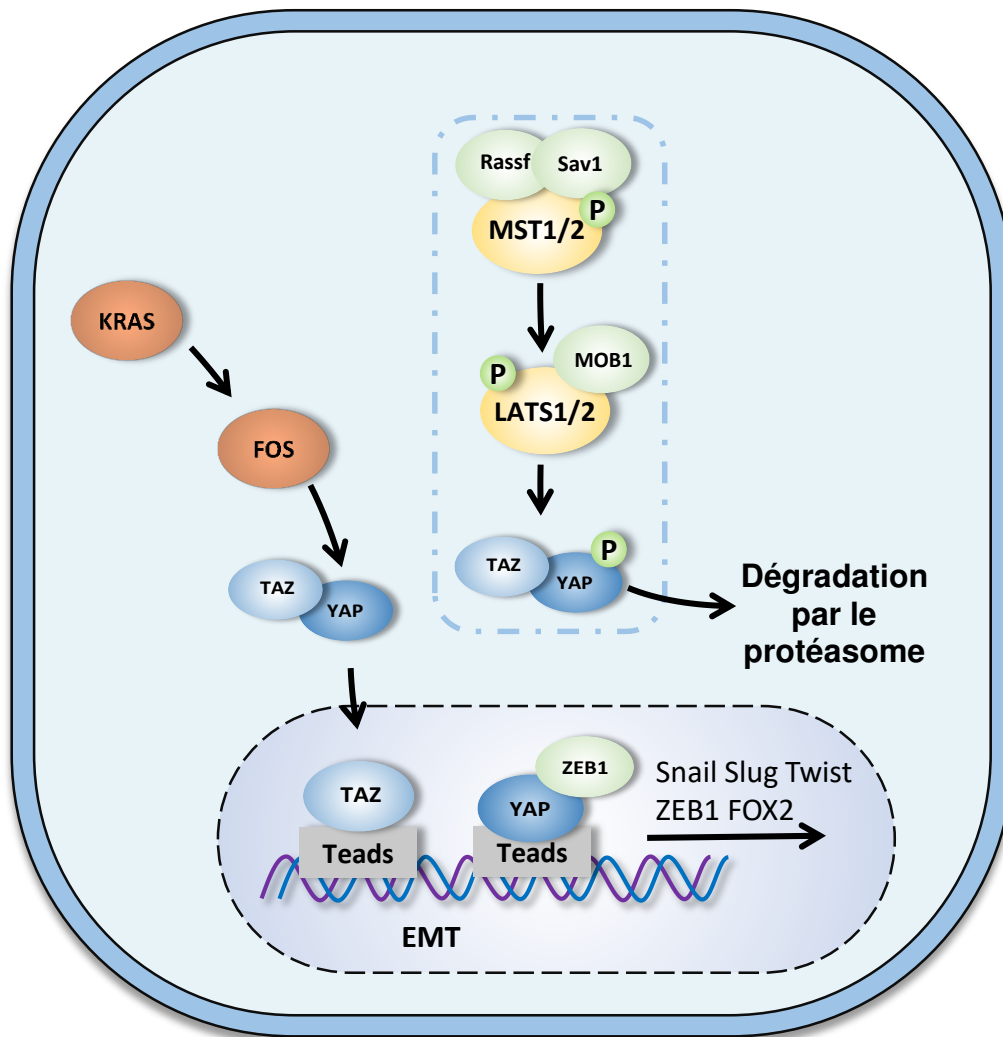


Figure 14 : La voie de signalisation Hippo coopère avec la voie du TGF- β /Smads pour initier l'EMT.

TAZ interagit avec TEAD pour induire l'expression de gènes mésenchymateux. YAP forme un complexe avec ZEB1 et favorise l'EMT. KRAS favorise la nucléarisation de YAP/TAZ via FOS et favorise l'EMT.

Après avoir subi l'étape d'EMT, les cellules tumorales ont alors une morphologie plus allongée et acquièrent la capacité à **migrer** et **envahir**. La dérégulation de la voie Hippo a été associée à plusieurs reprises à la régulation de ces deux mécanismes majeurs dans la formation de métastases, notamment dans le cancer du sein, le gliome, et le cancer du côlon²⁰²⁻²⁰⁵. Les facteurs activant les protéines effectrices YAP et TAZ agissent la plupart du temps au niveau des kinases régulatrices de la voie Hippo, comme l'acide lysophosphatidique ou bien le TGF- β ^{129,206-208}. La plupart des cibles transcriptionnelles du YAP/TAZ-TEAD pouvant impacter la migration ont été identifiées, on retrouve notamment CYR61 et CTGF²⁰⁹⁻²¹¹. Les

études publiées aujourd'hui impliquent à chaque fois le facteur de transcription TEAD dans le processus de migration médiée par YAP.

Suis alors l'étape d'**intravasation** essentielle pour que les cellules tumorales rentrent dans la circulation sanguine. Deux études publiées récemment ont impliqué YAP dans ce processus. La perte de l'activité kinase de LATS induit l'intravasation de cellules tumorales mammaires via YAP, les mêmes résultats ont été retrouvés dans le mélanome uvéal présentant une mutation sur GNAQ activatrice de YAP^{131,212}. Cependant, les mécanismes moléculaires pouvant expliquer le rôle de YAP dans l'intravasation ne sont pas encore décrits.

Dans la circulation sanguine, les cellules tumorales doivent résister aux stress mécaniques, à la surveillance des cellules immunitaires mais surtout à l'anoïkose, la mort par apoptose causée par la perte des jonctions entre les cellules et la MEC. La voie Hippo est connue pour son rôle dans la survie cellulaire, notamment quand YAP est actif on observe une inhibition de l'apoptose via la répression de la protéine BCL2-like1 et la stimulation de la protéine anti-apoptotique IAP²¹³. En 2012 Zhao et al ont expliqué les mécanismes moléculaires permettant à YAP de contrôler la survie des cellules tumorales : ce sont les kinases en amont de YAP, spécifiquement LATS1/2, qui régulent son activation et donc son implication dans la survie des cellules tumorales²¹⁴.

Enfin, l'étape d'**extravasation** permet aux cellules tumorales de quitter la circulation sanguine afin d'envahir le tissu secondaire. Sharif et al ont montré dans la souris et le zebrafish que l'inhibition de YAP dans des cellules tumorales mammaires diminue l'extravasation et la colonisation²¹⁵.

Toutes ces études suggèrent l'implication de YAP/TAZ dans différentes étapes du processus métastatique en induisant l'EMT, l'intravasation et la survie des cellules tumorales. Cependant les mécanismes moléculaires sont encore mal définis et le niveau de preuves scientifiques de certaines études reste peu satisfaisant. De plus, la plupart des recherches se portent sur le rôle du couple YAP/TEAD dans les processus métastatiques, nous savons que la voie Hippo agit en réseau avec d'autres voies de signalisation, notamment la voie du TGF- β connue pour être pro-métastatique dans différents types de cancer. Il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires associés à l'interaction de YAP avec d'autres facteurs de transcription partenaires dans les différentes étapes du processus métastatique.

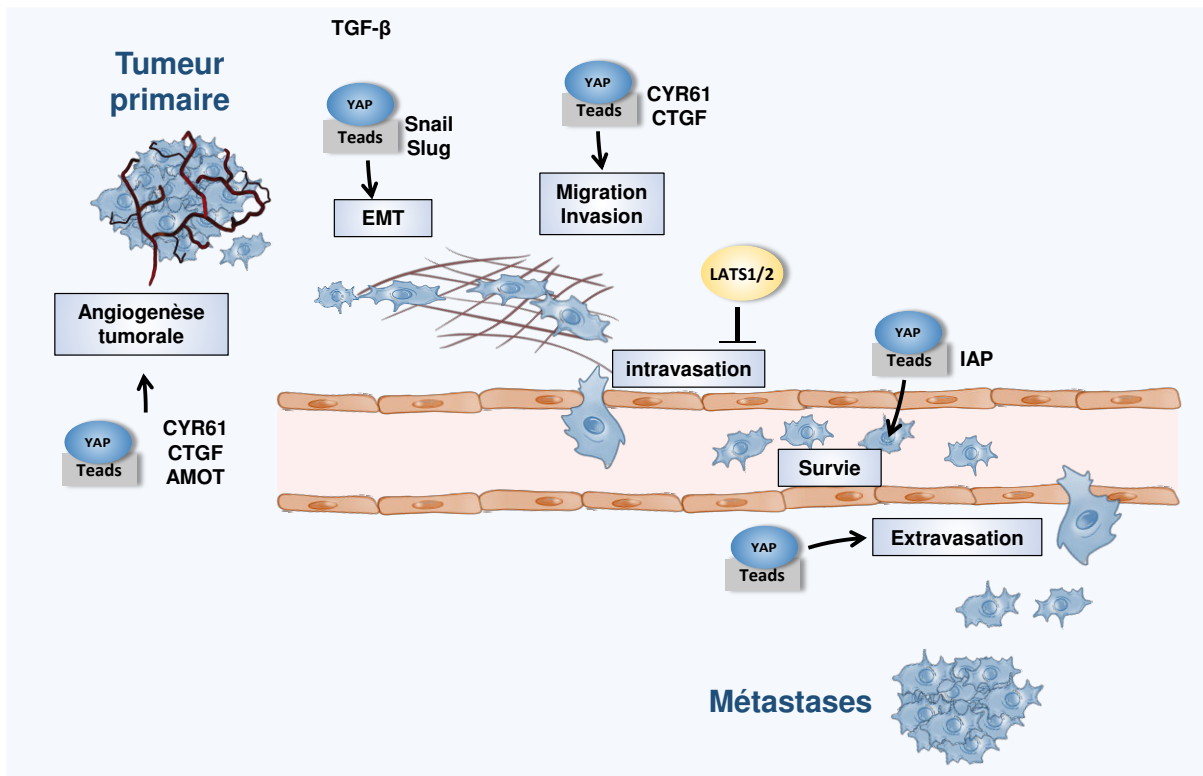


Figure 15 : La voie de signalisation Hippo favorise la dissémination métastatique.

En interagissant avec son facteur de transcription TEAD, YAP favorise l'angiogénèse tumorale, l'EMT, la migration, l'invasion et l'intravasation, inhibe l'anoïkose et favorise l'extravasation pour permettre aux cellules tumorales de métastaser.

(d) Résistance aux traitements anticanciers

Malgré les nombreuses améliorations dans les traitements contre le cancer ces dernières années, la résistance aux traitements de chimiothérapie reste un problème majeur et non élucidé, empêchant la rémission totale de certains patients. Les tumeurs malignes sont complexes et les mécanismes de survie cellulaire sont multiples empêchant les traitements actuels d'être totalement efficace. De plus, les réponses aux agents de chimiothérapie diffèrent d'un patient à un autre du fait de l'hétérogénéité tumorale. On distingue deux types de mécanismes de résistance aux chimiothérapies, la résistance innée qui est intrinsèque à la cellule et la résistance acquise qui apparaît après les traitements. Différents mécanismes sont impliqués dans l'acquisition de la résistance, tel que les ABC transporteurs, l'amplification des cibles thérapeutiques, l'apparition de mutations sur les cibles, des mutations sur des protéines faisant partie de la même voie de signalisation ou l'activation de voies de signalisation alternatives. La résistance acquise peut avoir également pour origine des changements épigénétiques ou une modification des interactions de la tumeur avec son microenvironnement²¹⁶⁻²¹⁸.

Il est essentiel de comprendre et décrypter les mécanismes moléculaires de résistance afin d'adapter les traitements et prévenir les rechutes. Compte tenu du rôle de la voie Hippo dans la survie cellulaire, des chercheurs ont étudié son implication dans la médiation de la résistance aux chimiothérapies les plus utilisées. Plusieurs études impliquent l'activation de YAP dans les résistances à différentes chimiothérapies, radiothérapies, mais aussi à certaines immunothérapies. Les mécanismes de résistance sont variés et peuvent être causés par l'inactivation des kinases régulatrices de la voie Hippo ou directement par l'activation des protéines YAP et TAZ^{216,219}.

Les altérations moléculaires sont des mécanismes majeurs dans le développement tumoral, les études sur ce sujet se sont largement développées ces dernières années grâce aux évolutions technologiques de séquençage à haut débit. Les chercheurs ont mis au point des molécules ciblant des mutations récurrentes dans la progression des cellules tumorales. L'efficacité de ces traitements varie en fonction de chaque patient et malheureusement, la plupart finissent par développer des résistances à ces thérapies ciblées. YAP pourrait fonctionner comme substitue à l'oncogène KRAS, la mutation la plus commune dans la plupart des cancers. Une étude menée dans le cancer du pancréas chez la souris montre que lorsqu'on inhibe l'oncogène KRAS^{G12D}, la tumeur régresse dans un premier temps mais la plus grande partie des animaux rechutent. De manière intéressante, les tumeurs en rechute ont acquis une amplification de YAP et un niveau d'activité du complexe YAP/TEAD2 élevé, capable de contourner l'oncogène KRAS en augmentant l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et dans la réplication de l'ADN^{220,221}. Une autre étude montre que l'activation de YAP peut rétablir la sensibilité à KRAS dans des cellules tumorales de colon après avoir subi une suppression de KRAS à l'aide de shRNAs²⁰⁰. Ces données semblent confirmer que l'activation de YAP pourrait induire la résistance aux molécules spécifiques dirigées contre la voie de signalisation RAS.

La voie des MAPKs (RAF-MEK-ERK) est un acteur central dans la régulation de la prolifération et la survie cellulaire, des mutations au cœur de la voie des MAPK activent la prolifération des cellules tumorales. Les inhibiteurs de BRAF (BRAFi) et de MEK (MEKi), ont montré leur efficacité dans le traitement des mélanomes présentant une mutation sur BRAF^{222,223}. Malheureusement, la résistance acquise est un processus récurrent qui intervient dans la majorité des cas après une courte période de rémission. Lin et al ont récemment

montré que YAP peut être un médiateur à la résistance aux BRAFi et aux MEKi²²⁴. Les cellules tumorales contournent les effets pro-apoptotiques médiés par les traitements BRAFi et MEKi en utilisant YAP comme voie de survie, la suppression de YAP augmentant significativement la sensibilité à ces molécules. De plus, il y a une augmentation du niveau d'expression de YAP chez les patients ayant un mélanome résistant aux BRAFi²²⁴. Enfin, une autre équipe de recherche a confirmé ces résultats à l'aide de cellules de mélanomes rendues résistantes à BRAF générées en administrant les inhibiteurs régulièrement. Ils observent en conséquence une accumulation de YAP au noyau en comparaison avec des cellules de mélanome naïves, la viabilité des cellules résistantes étant supérieure et dépendant de l'activité de YAP²²⁵. Les mutations dans la voie des MAPK sont fréquentes et existent dans de nombreux types de cancer. La combinaison d'inhibiteurs de YAP et des inhibiteurs de la voie des MAPK pourraient prévenir la résistance des cellules tumorales aux thérapies ciblées²²⁶.

Les mutations sur la protéine EGFR sont également des mécanismes oncogènes majeurs dans le développement de certains cancers, les molécules dirigées contre cette protéine ont montré leur efficacité. Cependant, des mécanismes de résistance inévitables apparaissent, notamment dans le cancer du poumon²²⁷. Des études *in vitro* ont montré que des cellules tumorales pulmonaires résistantes aux inhibiteurs d'EGFR présentaient une augmentation de l'expression de YAP et une accumulation nucléaire de cette protéine. De plus, la surexpression de YAP diminue la sensibilité des cellules tumorales aux inhibiteurs d'EGFR²²⁸.

Les phénomènes de résistances n'apparaissent pas uniquement à la suite de thérapies ciblées, mais aussi après des chimiothérapies plus classiques composées d'agents cytotoxiques interférant avec la division cellulaire et la survie cellulaire. Les premiers mécanismes de résistances aux chimiothérapies mis en évidence étaient d'ailleurs la découverte des transporteurs ABC dans les cellules tumorales, permettant le transport des agents cytotoxiques en dehors de la cellule²¹⁶. L'utilisation de ces agents cytotoxiques est inévitable pour la plupart du temps, mais le traitement n'est presque jamais curatif, les cellules tumorales finissant par devenir résistantes résultant en l'absence de réponse aux agents de chimiothérapies. L'absence de régulation de YAP par les kinases régulatrices de la voie Hippo pourrait jouer un rôle dans la résistance aux agents cytotoxiques, notamment aux molécules provoquant des dommages à l'ADN telles que la cisplatine, utilisée dans le traitement de

nombreux cancers, incluant l'ostéosarcome. Trois études publiées récemment montrent que YAP confère la résistance à la cisplatine dans le carcinome épidermoïde de la cavité buccale, carcinome à cellules transitionnelles et le cancer des ovaires²²⁹⁻²³¹.

Enfin, YAP favoriserait la résistance aux thérapies combinées dans le carcinome hépatique via la voie de signalisation RAC1-ROS-mTOR²³².

Ces études montrent l'implication de la voie Hippo dans le développement de résistances aux traitements de chimiothérapie actuels, cependant les mécanismes moléculaires à l'origine des phénomènes de résistance restent à élucider. De plus, il existe très peu de molécules inhibant spécifiquement l'activité de YAP, il est alors difficile d'étudier les effets de thérapies combinant plusieurs chimiothérapies et un inhibiteur de YAP.

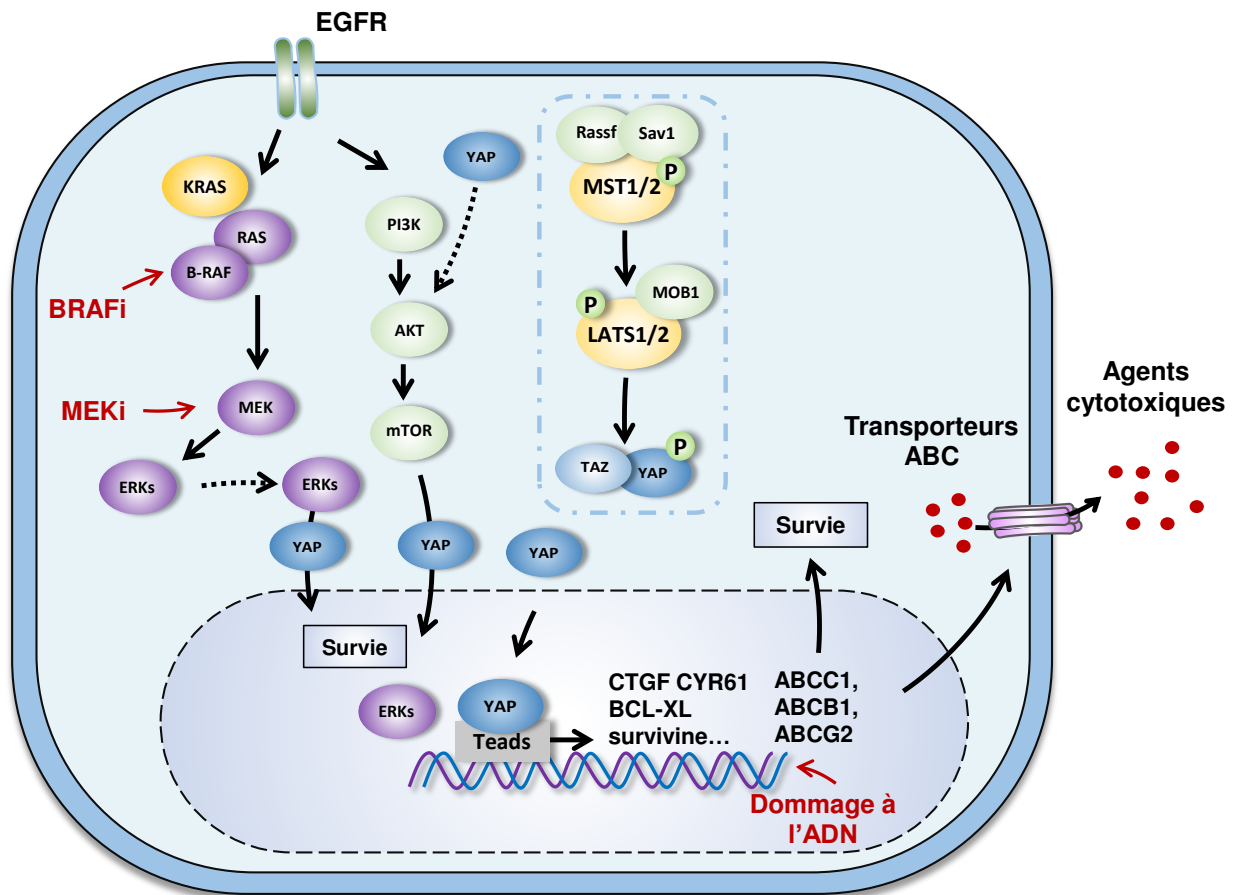


Figure 16 : La voie de signalisation Hippo participe aux mécanismes de résistance aux agents de chimiothérapie.

YAP permet aux cellules tumorales de contourner les effets pro-apoptotiques induits par les molécules ciblant B-RAF et MEK, en favorisant l'expression de gènes de survie. En réponse aux agents cytotoxiques causant des dommages à l'ADN, YAP/TEAD induit l'expression de gènes codant pour des transporteurs ABC permettant l'efflux des agents cytotoxiques en dehors de la cellule tumorale.

3) Implication de la voie de signalisation Hippo dans la biologie des sarcomes

Les sarcomes auraient pour origine, dans la plupart des cas, des progéniteurs mésenchymateux capables de se différencier en ostéoblastes qui subissent des mutations résultant alors en la formation de cellules cancéreuses²³³. La voie Hippo exprimée dans ces cellules souches mésenchymateuse et dans un tissu sain permet la régulation de la différenciation. Un dysfonctionnement au cœur de la voie de signalisation pourrait entraîner la formation de cellules pro tumorales et le développement de cancers osseux ou sarcomes des tissus mous²³⁴.

Les composants de la voie de signalisation Hippo sont exprimés dans les muscles squelettiques, les myoblastes et myotubes. YAP peut servir de co-activateur pour le facteur de transcription PAX3, indispensable au développement musculaire²³⁵. Le rhabdomyosarcome est une tumeur ayant pour origine les cellules musculaires squelettiques, caractérisées par la surexpression des protéines MYOD1 et myogénin. Les premières évidences de dérèglement au sein de la voie Hippo dans le rhabdomyosarcome sont apparues en 2014, notamment dans une étude publiée par Fernando D. Camargo et son équipe : YAP est fortement exprimée chez des patients atteints de rhabdomyosarcome, de plus, la surexpression de cette protéine augmente la prolifération cellulaire *in vitro* dans des cellules tumorales^{236,237}.

Dans le sarcome d'Ewing, la tumeur osseuse maligne la plus fréquente chez les enfants de moins de 15 ans, une étude *in vitro* a montré une forte expression de YAP associée à l'expression de la protéine pro-oncogène BMI-1²³⁸⁻²⁴⁰. De plus, une étude clinique a montré une localisation très nucléaire de YAP dans des biopsies de certains patients atteints de sarcome d'Ewing, sans pour autant avoir un impact sur le pronostic vital. Les quelques études publiées à ce sujet suggèrent un faible impact de YAP dans le diagnostic du sarcome d'Ewing, cependant la thématique reste encore peu étudiée²⁴¹.

La voie Hippo et ses effecteurs régulent aussi la prolifération et maturation des ostéoblastes, une perturbation au cœur de la cascade de kinase pourrait être à l'origine de la formation de tumeur, notamment de cellules d'ostéosarcome. Encore une fois, peu d'équipes de recherche travaillent sur ce sujet, mais quelques publications soulignent l'implication de la voie Hippo dans la survie et la prolifération des cellules d'ostéosarcome. Deux études pertinentes ont notamment décrit deux mécanismes moléculaires pouvant expliquer le rôle de la voie Hippo dans l'ostéosarcome. En 2014, un article publié par LH Chan et al. Explique comment Hedgehog a un rôle oncogène dans l'ostéosarcome via l'activation de YAP1. La même année, Claudio Basilico et son équipe ont mis en évidence l'interférence de Sox2 dans la cascade de phosphorylation Hippo, entraînant une augmentation de l'activité de YAP^{242,243}.

Ces recherches sont confirmées grâce à des analyses immunohistochimiques de biopsies de patients atteints d'ostéosarcome dans deux études publiées en 2016 par Bouvier et al. YAP est fortement exprimé dans l'ostéosarcome par rapport au tissu environnant la tumeur, et surtout sa localisation est principalement nucléaire. Le niveau d'expression de YAP est corrélé

à la survie des patients, ce qui peut être un facteur permettant d'établir le pronostic vital lors du diagnostic¹⁶⁵.

G. Molécules et inhibiteurs chimiques ciblant la voie hippo

Etant donné son rôle critique dans de nombreuses pathologies, cibler la voie de signalisation Hippo semble être une approche thérapeutique intéressante notamment en oncologie. La plupart des inhibiteurs se concentrent sur l'inhibition de l'interaction YAP-TEAD, mais d'autres molécules inhibitrices des régulateurs en amont de YAP ont été testées²⁴⁴.

La molécule la plus communément utilisée est la verteporfine. C'est une molécule dérivée de benzoporphyrine déjà utilisée en clinique dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge par thérapie photo dynamique. Liu-Chittenden et al. ont identifié 71 molécules inhibant l'activité de TEAD dans des HEK293. Parmi ces 71 composants, trois molécules membres de la famille des porphyrines ont montré une forte capacité à inhiber l'activité transcriptionnelle de YAP/TEAD. La verteporfine a été sélectionnée parmi ces molécules pour tester les effets de l'inhibition de YAP. Son efficacité a été prouvée pour inhiber la croissance exagérée du foie après avoir surexprimé YAP dans cet organe²⁴⁵.

Depuis la découverte de la verteporfine en 2014, plusieurs études l'ont utilisé *in vitro* et *in vivo* comme inhibiteur pharmacologique. La molécule inhibe la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs modèles de carcinomes, notamment en inhibant l'expression de facteurs oncogènes tel que c-myc ou certaines cyclines^{246,247}. La verteporfine ralentit le cycle cellulaire de cellules de rétinoblastome avec une accumulation de cellules en phase G0/G1²⁴⁸. Le composé est également capable d'augmenter la mort cellulaire en augmentant l'expression de PARP-1 clivé ou de la caspase-3 clivée, qui sont des facteurs essentiels dans le processus de mort par apoptose²⁴⁷. Une étude a reporté l'efficacité de la verteporfine pour la re-sensibilisation à la chimiothérapie dans des cellules tumorales résistantes²⁴⁹. Au niveau transcriptionnel, la verteporfine entraîne une perte d'expression de gènes cibles de la voie Hippo tel que Cyr61 et CTGF dans différents types cellulaires^{248,250,251}. La plupart des publications se focalisent sur l'inhibition de l'interaction YAP/TEAD, cependant quelques études ont montré une baisse d'expression de YAP associée à la rétention cytoplasmique de la protéine. Ces dernières recherches mettent également en avant les effets non spécifiques de la verteporfine^{252,253}.

D'autres molécules ont été identifiées, notamment le dasatinib qui est un inhibiteur de tyrosine kinase utilisé dans le traitement de certaines leucémies myéloïdes chroniques. Le dasatinib inhibe la kinase Src, ce qui perturbe la cascade JNK-LIMD1-LATS et par conséquent inhibe la translocation nucléaire de YAP. Pour le moment, peu d'études montrent le rôle essentiel de l'axe Src-YAP dans le développement tumoral, mais l'induction de la phosphorylation de YAP est une approche pharmacologique à développer. Inhiber directement l'activité de YAP reste un défi dans la recherche en oncologie^{254,255}. Récemment, une nouvelle molécule qui inhibe les topoisomérases, l'A35, a montré une certaine efficacité pour phosphoryler YAP sur sa sérine 127 ce qui bloque sa translocation nucléaire²⁵⁶.

Piccolo et son équipe ont montré très récemment l'interaction entre YAP et BRD4, une protéine de la famille des BET. BRD4 se lie aux histones acétylées et recrute des facteurs de transcription à l'ADN. Le JQ1 est un inhibiteur compétitif de BRD4 et diminue la quantité de gènes transcrits dépendant de YAP²⁵⁷.

La voie de signalisation Hippo représente une réelle opportunité dans le traitement du cancer. L'activation et la surexpression de YAP sont associées à la formation de cellules tumorales et à la progression du cancer. Il n'y a malheureusement aujourd'hui aucune molécule utilisable en clinique ciblant spécifiquement la voie Hippo. Identifier de nouveaux composants spécifiques de la voie Hippo, et notamment de YAP, reste un enjeu pour les sociétés pharmaceutiques.

III. Objectifs de la thèse

La voie de signalisation Hippo est largement décrite dans les mécanismes de développement embryonnaire ainsi que dans différentes pathologies, notamment le cancer. Cependant, l'implication de la voie Hippo et notamment de la protéine YAP dans le développement des ostéosarcomes restent à élucider.

Bouvier et al., ont mis en évidence la présence de YAP au niveau nucléaire par immunohistochimie sur des biopsies de patient atteint d'ostéosarcome. De manière intéressante l'expression élevée de YAP est corrélée avec la présence de métastases chez ces patients²⁵⁸.

A l'heure actuelle, la dissémination métastatique de l'ostéosarcome reste un enjeu majeur dans le traitement de cette maladie et dans la recherche en cancérologie en générale.

Une meilleure compréhension des mécanismes impliquant la voie Hippo et ses effecteurs dans la prolifération des cellules d'ostéosarcome mais aussi dans les mécanismes de migration cellulaire pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes. Il existe très peu de molécules ou traitement dans la recherche en cancérologie pédiatrique, encore moins dans les sarcomes osseux. Du fait de la rareté de cette pathologie, peu de moyens sont mis en œuvre. En effet, ni les traitements ni la survie n'ont évolué depuis les années 1970, époque où la chimiothérapie néoadjuvante est venue s'ajouter à la chirurgie résectrice des ostéosarcomes. La dissémination métastatique reste un enjeu majeur dans le traitement des ostéosarcomes, la survie à 5 ans reste figée à 20% lorsque des métastases sont présentes au diagnostic. C'est pourquoi identifier de nouvelles cibles thérapeutiques visant à la fois la croissance de la tumeur primaire et les métastases pour majorité pulmonaire est essentiel dans le traitement de cette maladie.

L'objectif majeur est d'approfondir les connaissances sur l'implication de la voie de signalisation Hippo et particulièrement YAP dans le développement de l'ostéosarcome.

Dans une première partie présentée sous forme d'article scientifique, nous avons établi différentes stratégies moléculaires et pharmacologique pour identifier d'une part le rôle de YAP dans la croissance de la tumeur primaire, et d'autre part son rôle dans le développement des métastases pulmonaires.

Nous avons généré des cellules d'ostéosarcome surexprimant deux formes mutées de la protéine YAP : les cellules qu'on nommera YAP-S94A, surexprimant la protéine YAP ne pouvant interagir avec le facteur de transcription TEAD, et les cellules YAP-S127A surexprimant la protéine YAP constitutivement active.

A l'aide de ces cellules d'ostéosarcome modifiées nous avons pu étudier le rôle de YAP, d'abord *in vitro*, dans les processus de prolifération et dans les processus de migration cellulaire et dissémination métastatique. Grâce à une analyse transcriptomique de séquençage haut débit, nous nous sommes intéressés aux différents profils génétiques induits par la surexpression de YAP dans l'ostéosarcome. Nous avons notamment exploré les différents partenaires de YAP dans les processus de prolifération cellulaire, migration cellulaire et d'EMT. En effet, les interactions de YAP avec d'autres facteurs de transcription sont connus, particulièrement avec Smad3, effecteur principal de la voie de signalisation du TGF- β . Le rôle de Smad3 est connu dans la dissémination métastatique de l'ostéosarcome et nous avons étudié l'impact de la surexpression de YAP dans ce contexte.

Nous avons poursuivi l'étude *in vitro* par des expériences *in vivo* à l'aide d'un modèle murin d'ostéosarcome. Nous avons suivi l'évolution de la croissance des tumeurs formées à partir des cellules mutées ainsi que la formation de métastases pulmonaires.

Enfin nous avons étudié l'effet de la vertéporfine, l'inhibiteur pharmacologique de la voie Hippo le plus utilisé, dans la progression tumorale de l'ostéosarcome.

Dans une partie présentée sous forme de perspective, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de résistance à la chimiothérapie dans l'ostéosarcome, qui est un des plus gros enjeux dans le traitement de cette maladie. Pour cela nous avons étudié les effets synergiques d'une molécule innovante, le CA3, décrit pour ses effets inhibiteurs de YAP/TEAD, avec les principaux agents de chimiothérapie utilisés dans le traitement de l'ostéosarcome.

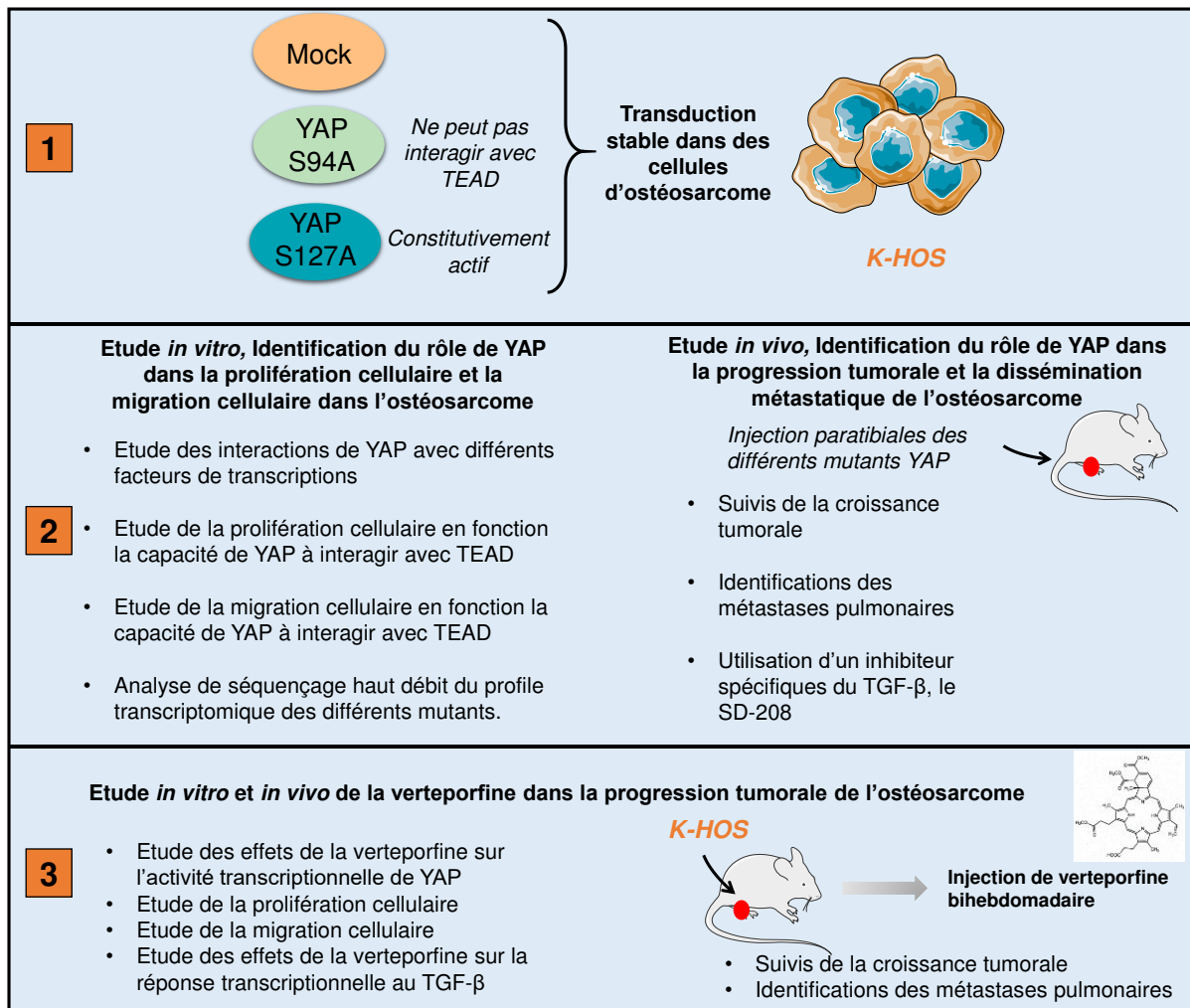


Figure 17 : Objectifs de cette étude.

1. Expression stable de différentes protéines mutées de YAP dans des cellules d'ostéosarcome KHOS. **2.** Analyse de la surexpression de YAP *in vitro* et *in vivo* dans des processus biologiques clés du développement tumorale **3.** Etude de la vertéporfine dans la progression tumorale de l'ostéosarcome.

RÉSULTATS

Rôle centrale de YAP dans la médiation de la croissance tumorale et la dissémination métastatique via, respectivement, TEAD et la voie de signalisation TGF- β /Smad

Sarah Morice, Geoffroy Danieau, Mathilde Mullard, Jérôme Amiaud, Régis Brion, Sarah Renault, Robel Tesfaye, Maryne Dupuy, Benjamin Ory, Bénédicte Brounais-Le Royer, Isabelle Corre, Anne Brouchet-Gomez, Françoise Redini and Franck Verrecchia

Article soumis à la revue scientifique Nature communication

L'ostéosarcome est la principale tumeur osseuse primitive maligne chez les enfants et les adolescents pour qui le pronostic reste mauvais, en particulier lorsque des métastases sont présentes au diagnostic. L'analyse de données d'expression d'une cohorte de patients atteints d'ostéosarcome révèle une signature génique associée à la voie Hippo. De plus, des expériences de proximity ligation assay et d'immunoprécipitation montrent l'existence d'interaction entre YAP et TEAD, principal effecteur de la voie de signalisation Hippo, dans des lignées cellulaires d'ostéosarcome.

Pour élucider le rôle de TEAD dans le développement de l'ostéosarcome médié par YAP, nous avons étudié les conséquences de l'activation de YAP à l'aide de vecteur d'expression de YAP, YAPS127A (YAP constitutivement actif) et YAPS94A (protéine YAP ne pouvant interagir avec TEAD).

Tout d'abord, des expériences *in vivo* et *in vitro* démontrent : a) le rôle crucial de TEAD dans la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* et b) une corrélation entre l'expression de TEAD1 et la survie des patients atteints d'ostéosarcome. Dans ce contexte, l'analyse RNA-seq et des tests d'enrichissement génique ont identifié plus de 300 gènes liés à la prolifération cellulaire qui sont significativement surexprimés dans les cellules YAPS127A par rapport aux cellules contrôles et aux cellules YAPS94A.

Nous avons étudié dans un second temps les effets de la voie de signalisation Hippo sur la dissémination métastatique de l'ostéosarcome.

Nous avons montré une augmentation de la migration cellulaire chez les cellules mutées KHOS-S94A et KHOS-S127A en comparaison aux cellules contrôles, suggérant que l'interaction YAP/TEAD n'est pas nécessaire dans le processus de migration dans l'ostéosarcome.

L'analyse transcriptomique de ces mêmes cellules a montré un enrichissement des gènes associés à l'EMT, à la migration cellulaire et au TGF- β dans les cellules KHOS-YAPS127A et KHOS-YAPS94A par rapport aux cellules contrôles, suggérant le rôle facultatif de TEAD dans ces processus biologiques.

Des expérimentations d'immunoprécipitation et de proximity ligation assay ont montré l'existence d'interaction entre YAP et Smad3 dans une lignée cellulaire d'ostéosarcome indépendamment de l'interaction YAP/TEAD. Dans ce contexte, en utilisant l'inhibiteur de T β R1, le SD-208, nous démontrons le rôle de la voie de signalisation TGF- β /smad dans la migration cellulaire et le processus de dissémination métastatique médiée par YAP dans l'ostéosarcome.

Enfin, nous avons étudié l'effet de la vertéporfine, identifiée comme un inhibiteur de la voie de signalisation Hippo, dans la progression tumorale de l'ostéosarcome. Des expériences *in vivo* ont montré que la vertéporfine réduit la croissance de la tumeur primaire et le développement des métastases pulmonaires. Des expériences *in vitro* ont démontré que la vertéporfine diminuait la viabilité cellulaire et inhibait l'activité transcriptionnelle médiée par le TGF- β /Smad3 impliqué dans le processus de dissémination métastatique de l'ostéosarcome.

Ensemble, ces résultats ont défini le rôle spécifique de TEAD et Smad3 dans la progression tumorale de l'OS, et permis l'identification de YAP comme un acteur central du développement de l'OS. Ainsi, YAP pourrait être une cible thérapeutique prometteuse dans l'OS.

Central role of YAP in mediating tumor growth and metastatic process *via* respectively TEAD and TGF- β /Smad signalling pathways

Sarah Morice¹, Geoffroy Danieau¹, Mathilde Mullard¹, Jérôme Amiaud¹, Régis Brion^{1,2}, Sarah Renault¹, Robel Tesfaye¹, Maryne Dupuy¹, Benjamin Ory¹, Bénédicte Brounais-Le Royer¹, Isabelle Corre¹, Anne Brouchet-Gomez³, Françoise Redini¹ and Franck Verrecchia^{1,*}

¹INSERM UMR 1238, Université de Nantes, Nantes, France

²CHU de Nantes, Nantes, France

³Service d'anatomie et cytologie pathologique, Institut Universitaire du Cancer Toulouse Oncopôle, Toulouse, France

*Correspondance : franck.verrecchia@univ-nantes.fr

Keywords: Hippo/YAP, TEAD, TGF- β /Smad, tumor growth, lung metastases, osteosarcoma

Conflict of interest statement

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Aberrant YAP expression signalling drives osteosarcoma progression and predicts a poor prognosis. Here, we demonstrate that depending on the transcription factor to which it will bind, YAP regulates key functions of tumor development. TEAD is crucial for YAP-driven cell proliferation and tumor growth. Interactions with TEAD is not required for YAP-driven osteosarcoma cell pro-migratory phenotype, EMT, cell migration and osteosarcoma lung metastases development. Regardless its ability to bind TEAD, YAP interacts with Smad3, stimulates Smad3 transcriptional activity and therefore enhances the ability of TGF- β to stimulate cell migration and lung metastases dissemination. Together we identify YAP as a central actor in mediating primary tumor growth and metastatic process via respectively TEAD and TGF- β /Smad cascades.

Introduction

Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignant bone tumor and the third most common cancer in children and adolescents ^{259,260}. The diagnosis of OS is based on clinical and radiological examinations, and histological evaluation of biopsies ²⁶¹. OS commonly originates in the metaphysis of long bones and is characterized by the production of osteoid matrix by mesenchymal cells²⁵⁹. Although some predisposing genetic factors such as p53 mutations have been identified ²⁶², the exact etiology of this disease remains unknown ^{260,263}.

Despite the introduction of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy following surgical tumor resection, the metastatic relapse or recurrent conditions remains unchanged over the last four decades ²⁶⁴. The presence of metastases at diagnosis remains the main cause of death in OS patients with approximately a 5-year survival rate of 20% compared to 70-75% for patients with localized disease ^{260,261,265}. Unfortunately, whereas only 15 to 20% of patients have clinically detectable lung metastases at diagnosis, it is suspected that 80 to 90% of them have undetectable micrometastases ²⁶⁶. Therefore, a better understanding of osteosarcoma biology is required to treat metastatic OS.

The highly conserved Hippo signaling pathway, originally identified as potent growth-suppressive signaling pathway in *Drosophila* ²⁶⁷, is activated by a variety of signals such as cell-cell interactions and plays a critical role in the regulation of many cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, migration and differentiation ²⁶⁷⁻²⁶⁹. The intracellular factors of the canonical Hippo signaling pathway are mainly composed of mammalian Ste20-like kinases 1/2 (MST1/2), large tumor suppressor 1/2 (LATS1/2), yes associated protein (YAP) and its paralog TAZ. Following the activation of the Hippo signaling pathway, activated MST1/2

proteins phosphorylate and activate LATS1/2 factors which, in turn, phosphorylate YAP/TAZ factors, resulting in the inhibition of YAP/TAZ activity. Of note, the phosphorylation of YAP on Ser127 allows its binding with the 14-3-3 protein, leading to its cytoplasmic sequestration and its degradation via the ubiquitin-proteasome pathway²⁷⁰. When the Hippo signaling pathway is not activated, YAP or TAZ are not phosphorylated and can thus translocate into the nucleus where they act as co-transcriptional factors. The primary DNA-binding partners of YAP are TEA-domain DNA-binding transcription factor 1-4 (TEAD1-4) proteins able to regulate target genes that control essential cellular process including proliferation, differentiation and apoptosis^{271,272}.

Accumulating evidence has shown that disruption of the Hippo signaling pathway or abnormal activation of YAP/TAZ is closely associated with many diseases such as cancers^{269,273–276}. In this context, YAP/TAZ have been shown to be crucial for different steps of cancer development such as cancer initiation, progression and metastasis²⁵⁷, and in tumors from different organs such as lung, prostate, breast, liver, stomach, pancreas or brain²⁵⁷.

Concerning primary bone tumors, tissue array analyses demonstrated a high level of YAP protein expression in OS tumor tissues compared to surrounding non-cancerous ones²⁷⁷ and associated to poor prognosis²⁷⁸. The molecular mechanisms underlying YAP overexpression in OS seem to be complex, but evidences suggest that it could be due in large part to the stem cell transcription factor SOX2²⁴¹. By using knockdown approaches, studies suggest that YAP and its transcriptional factor TEAD1 participate to the control of OS cell lines proliferation^{279,280}. However, the molecular mechanisms by which YAP regulate both tumor growth and lung metastatic process remain to be elucidated.

In this work, using *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrated the respective role of TEAD1 and TGF- β /Smad3 signalling pathways in YAP-mediated OS tumor growth and metastatic process. In addition, we observed that treatment of mice with the Hippo inhibitor verteporfin blocks primary tumor growth as well as the development of lung metastasis.

Results

The elevation of Hippo target genes expression in OS patients is associated with the overall survival of patients.

To resolve outstanding questions regarding the role of Hippo signaling pathway in OS development, we first looked for a hypothetical Hippo signature in OS patients using publicly available databases.

Gene set enrichment analysis (GSEA) of expression data obtained by using RNAseq assays from a cohort of OS patients comprising 15 OS samples, reveals a Hippo conserved signature in OS samples as compared to normal bone samples from the same patient (Figure 1A, Human Osteosarcoma vs. Matched normal tissue, and Figure S1A), suggesting an hyperactivity of the Hippo signaling pathway in OS patients. Indeed, multiple Hippo-regulated genes are significantly overexpressed in OS compared with bone normal tissue. These include, for example, CYR61, THBS1, PAI-1, and BIRC5, previously described as YAP target genes in tumor tissues (Figure 1A and Figure S1B). Consistently, YAP is overexpressed in OS samples compared with normal tissue from the same patient (Figure 1B). Interestingly, high YAP transcripts significantly correlate with poor survival outcome in OS patients as illustrated in the Kaplan-Meier plot in Figure 1C.

Taken together these results highlight that the Hippo/YAP signature correlated with a poor survival outcome in OS patients.

OS cell proliferation and *in vivo* OS tumor growth critically depend on YAP-TEAD interaction

Since previous studies indicated that activation of the Hippo/YAP signaling pathway induces tumor progression through the recruitment of YAP to DNA by the TEAD transcription factor family, we initially began our analysis by examining the relationship between YAP and TEAD in a panel of three human OS cell lines: HOS, MG63 and G292 cells. In situ PLA assays clearly demonstrate that YAP and TEAD were interacting (proteins localized within 40 nm of each other) in the nucleus of OS cell lines (Figure 2A and Figure S2A).

In order to elucidate the role of TEAD in YAP-driven OS development, we then probed the consequences of YAP activation able or not to interact with TEAD, using overexpression of either YAPS127A (constitutively active, TEAD-binding YAP protein) or YAPS94A (TEAD-binding deficient YAP protein). We first verified the expression and functionality of these mutated YAP expression vectors in transient transfection assays. As expected, unlike YAPS127A, YAPS94A proteins are unable to bind TEAD1 (Figure S2B) and do not induce a transcriptional response in OS cells (Figure S2C). Using retroviral infection, we then established K-HOS clones stably overexpressing YAPS127A, YAPS94A or empty vector (Figure 2B). As shown in Figure 2C YAPS94A- and YAPS127A-transfected cells express high levels of YAP mRNA (left panel) and YAP protein (right panel). In situ PLA assays demonstrate increased YAP-TEAD interactions in the nucleus of K-HOS cells in YAPS127A cells compared to YAPS94A- or mock-transfected cells (Figure 2D). In addition, unlike YAPS94A and mock-transfected cells, YAPS127A cells exhibit an increased-TEAD transcriptional response as measured by luciferase reporter gene assay with the TEAD-specific reporter construct (TEAD)₈-lux (Figure 2E).

Using these OS cellular tools, we then examined the functional role of TEAD in YAP-driven OS cell proliferation and *in vivo* tumor growth. Real time proliferation assays demonstrate an increase of OS cell proliferation when YAPS127A was overexpressed compared with the ability of OS cells to proliferate when YAPS94A or an empty vector is overexpressed (Figure 2F). Interestingly, cell cycle analysis showed an acceleration of the cell cycle when YAPS127A was overexpressed. Indeed, 10h after the replacement of the thymidine-containing culture medium (able to block OS cells in the S-phase) with fresh medium, the number of OS cells in G1 phase is significantly increased when YAPS127A is overexpressed (YAPS127A vs mock-transfected cells and YAPS127A vs YAPS94A cells) (Figure S2D). In addition, a preclinical experimental model of OS induced by paratibial injection of either YAPS94A-, YAPS127A- or mock-transfected OS cells demonstrates the crucial role of TEAD in YAP-driven *in vivo* OS tumor growth (Figure 2G). Indeed, 30 days after cell injection, the tumor volume is significantly increased when TEAD-interacting YAP is overexpressed (Figure 2G, YAPS127A cells vs mock-transfected cells and YAPS127A cells vs YAPS94A). Interestingly, the tumor volume is significantly reduced when TEAD-binding deficient YAP is overexpressed (YAPS94A vs mock-transfected cells and YAPS94A- vs YAPS127A-transfected cells).

To gain more insights in the crucial role of TEAD in YAP-driven cell proliferation and tumor growth, we then compared the RNA sequencing transcriptional profiles of YAPS127A-, YAPS94A- or mock-transfected cells. As shown in Figures S2E-G, mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected cells display distinct transcriptional profiles, with multiple genes significantly differentially expressed. Transcriptional analysis thus identifies 1617 genes whose expression is regulated by the overexpression of the YAP mutated proteins able to bind TEAD (YAPS127A) or not (YAPS94A). Among them, 559 genes require the interaction between YAP and TEAD (Figure 2H). GSEA identifies many genes related to cell proliferation (Figure 2I) that are significantly overexpressed in YAPS127A cells (compared to mock- or YAPS94A-transfected cells). These include genes directly involved in the control of cell cycle such as CCNA1, CCND1, CCNB2, CCNE1 or CDC25B and cell proliferation such as Gli1 or AKT (Figures 2I and Figure S2H). In contrast, in YAPS94A cells, the expression of most genes related to cell proliferation is either not modified (such as CCNA1, CCND1, CCNB2, CCNE1 or CDC25B) (Figure 2I and Figure S2H) or downregulated such as CDK4 for example (Figure 2I). Interestingly, quantitative-PCR analysis indicated that the expression of CCND1, gli1 and AKT genes by tumor cells from mice biopsies was upregulated when YAP able to interact with TEAD was over-expressed (Figure 2J and Figure S2I), strongly suggesting the crucial role of TEAD in YAP-driven gene expression implicated in the regulation of both OS cell proliferation and *in vivo* tumor growth.

Finally, to decipher the clinical importance of the role played by TEAD in OS tumor development, we analyzed TEAD gene expression using data extracted from the GSE99671 database²⁸¹. Analysis of OS RNAseq data demonstrates that TEAD is overexpressed in OS biopsies compared with control samples from the same patient (Figure 2K). Interestingly, high TEAD transcripts significantly correlate with poor survival outcomes in OS patients as illustrated in the Kaplan-Meier plot in Figure 2L.

Taken together, these results demonstrate: a) the crucial role of TEAD in YAP-driven cell proliferation and *in vivo* tumor growth in OS cells and OS preclinical models, and b) a correlation between the expression of TEAD and the survival outcomes of OS patients.

Regardless of its binding to TEAD, YAP promotes pro-migratory cell phenotype and *in vivo* metastatic progression

To fully understand the role played by YAP in OS progression, we next examined the effect of YAP overexpression on pulmonary metastasis progression as depicted in Figure 3A. Although the primary bone tumor volume is considerably reduced (Figure 2G), the overexpression of TEAD binding-deficient YAPS94A increases the number of lung metastasis (Figure 3B; YAPS94A- vs mock-transfected samples), suggesting that in absence of TEAD binding, YAP is still able to stimulate metastatic development. Of note, YAPS127A overexpression that increases the tumor volume (Figure 2G), also increases the number of lung metastases (Figure 3B). Interestingly, analysis of OS RNAseq data demonstrates that YAP is overexpressed in OS patients with metastases compared with OS patients without metastases (Figure 3C).

To further corroborate the role of YAP in the metastatic process, we then compared the morphology of YAPS127A-, YAPS94A- or mock-transfected cells by analyzing F-actin cytoskeleton and focal adhesions, revealed by phalloidin labelling and vinculin immunostaining, respectively. As shown in Figure 3D, cells expressing YAP mutated proteins (YAPS127A- or YAPS94A-transfected cells) show a similar profile of elongated cells, different from mock-transfected cells, with increased actin stress fibers and focal adhesions at the cell front. This phenotype is indicative of pro-migratory properties of YAP-transfected cells, regardless of the mutated form of YAP and consequently independent of YAP/TEAD binding.

Against this background, GSEA analysis shows a statistically significant enrichment of Focal adhesion-related genes in YAPS94A- and YAPS127A- transfected cells compared to mock-transfected cell strongly suggesting that TEAD is not required in YAP-driven expression of genes related to focal adhesion. These include genes coding for G-proteins such as RHOB and RHOD, chemokine receptors such as CXCR4 or FAK stimulator such as THBS1 (Figure 3E and Figure S3A).

The process of EMT of carcinoma exists as an EMT- “like” in tumors from mesenchymal origin such as OS and confers to cancer cells an increased in their motility potential. Interestingly, the expression of genes involved in EMT-“like” in OS, such as N-cadherin, Snail, Twist2 and vimentin, is significantly increased in cells expressing YAP able or not to interact

with TEAD (YAPS94A- or YAPS127A- cells vs mock-transfected cells, Figure 3F and Figure S3B). To check whether the acquisition of this pro-migratory phenotype results in an increase of cell migration, we performed real-time migration assays. As shown in Figure 3G, both YAPS94A and YAPS127A overexpression significantly increase the ability of OS cell to migrate. In further support, GSEA analysis revealed that YAPS127A and YAPS94A overexpression is positively associated with genes involved in cell migration compared to mock-transfected cells, strongly suggesting that TEAD is not required in YAP driven the expression of genes related to cell migration. Furthermore, RT-qPCR analysis indicates that YAPS94A and YAPS127A overexpression induces the expression of MMP-2 and MMP-9, two metalloproteinases playing a crucial role in the cell invasion process (Figure 3I). Moreover, zymography assays demonstrate that YAPS94A and YAPS127A overexpression strongly stimulate the enzymatic activity of MMP-2 and MMP-9 (Figure 3J).

Taken together, these results demonstrate: a) that interaction with TEAD is not required for YAP-driven cell migration and OS lung metastases development, and b) a correlation between YAP expression and the presence of metastases in OS patients.

OS cell migration and *in vivo* metastatic process depend on YAP-Smad3 interaction

Since studies indicated that Hippo and TGF- β /Smad3 signaling pathways are known to interact in the control of gene transcription²⁸² and as we previously demonstrated that the TGF- β pathway plays a crucial role in lung metastasis development in OS¹⁹⁵, we investigated the connection between these two pathways in OS metastatic process. We first examined the relationship between YAP and Smad3 in a panel of three human OS cell lines: HOS, MG63 and G292 cells. In situ PLA assays clearly demonstrate an increase of nuclear YAP-Smad3 interactions in OS cell lines upon TGF- β stimulation (Figure 4A and Figure S4A). We then studied the ability of YAP mutated protein YAPS94A, not able to interact with TEAD, to interact with Smad3 protein. Immunoprecipitation assays clearly demonstrate interactions between YAPS94A and Smad3 revealing that the ability of YAP to interact with TEAD is not required for the protein-protein interaction between YAP and Smad3 (Figure 4B). Furthermore, YAPS94A and YAPS127A both increase the ability of TGF- β to trans-activate the Smad3/4-specific reporter construct (CAGA)₉-lux in OS cells (Figure 4C and Figure S4B).

To elucidate a potential role of TGF- β /Smad3 signalling in YAP-driven OS metastatic process, we then probed the consequences of the stably overexpression of the YAPS127A and YAPS94A mutated proteins, both able to interact with Smad3, in K-HOS cells. In situ PLA assays demonstrate an increase of TGF- β -driven YAP-Smad3 interactions in the nucleus of YAPS94A- and YAPS127A-transfected cells compared with the number of interactions measured in mock-transfected cells (Figure 4D). In addition, YAPS94A-transfected cells exhibit a strong increase of TGF- β -transcriptional response as measured by transient cell transfection experiments with the Smad3/4-specific reporter construct (CAGA)₉-lux (Figure 4E). Furthermore, RT-qPCR and zymography analyses indicate that YAPS94A and YAPS127A overexpression increases the ability of TGF- β to stimulate MMP-2 and MMP-9 expression (Figure 4F) and activation (Figure 4G). In addition, RT-qPCR analysis indicates that YAPS94A and YAPS127A overexpression enhances the ability of TGF- β to stimulate the expression of VEGF and PDGF, two cytokines that play a crucial role in the angiogenesis process (Figure S4C).

GSEA analysis reveals a statistically significant enrichment of early TGF- β pathway-regulated genes in the YAPS94A- compared to mock-transfected cells, and of delayed TGF- β pathway-regulated genes in the YAPS94A- and YAPS127A- compared to mock-transfected cells. These include genes of the extracellular matrix (ECM) such as COL1A1 or MMP-1 (Figure 4H, and Figures S4D and S4E). Among them, some are involved in cell adhesion such as LAMA2 and LAMA4 and cell migration and invasion such as THSB1, MMP-2 and MMP-9 (Figure 4F, Figures S4D and S4E).

To validate the biological relevance of our findings, we next investigated whether the inhibition of TGF- β /Smad3 signaling pathway in OS cells could alter the capacity of YAP to enhance lung metastases development. Therefore, we used SD208, an ALK5 inhibitor previously described as an inhibitor of TGF- β /Smad3 signaling pathway in OS cells¹⁹⁵ and showed as expected that SD-208 efficiently blocks the ability of TGF- β to transactivate the Smad3/4-specific reporter construct (CAGA)₉-lux, and the ability of YAPS94A and YAPS127A to increase TGF- β responsiveness (Figure S4F). Interestingly, SD-208 blocks the ability of both YAPS94A and YAPS127A mutated proteins to increase the number of lung metastases in mice models (Figure 4I), demonstrating the crucial role of TGF- β /Smad3 in YAP-driven lung metastases development.

Finally, to reveal the clinical importance of the role played by Smad3 in OS tumor development, we analyzed Smad3 gene expression using data extracted from the GSE21257 database. High Smad3 transcripts significantly correlate with the presence of metastases (Figure 4J) and the poor survival outcomes in OS patients as illustrated in the Kaplan-Meier plot in Figure 4K.

Taken together, these results demonstrate: a) that YAP interacts with Smad3 independently of its ability to interact with TEAD and stimulates the response of cells to TGF- β , b) that the TGF- β /Smad3 signaling pathway plays a crucial role in YAP-driven OS cell migration and *in vivo* lung metastases development, and c) a correlation between the expression of Smad3 and both the presence of metastases and the survival outcomes of OS patients.

Role of the Wnt signalling pathway in YAP-stimulation of tumor mineralisation

Analysis of mice OS biopsies issued from YAPS94A, YAPS127A-transfected K-HOS reveals a mineralized appearance with an increase of ECM production (Figure 5A), reproducing the clinical observations in patients, but surprisingly more in the YAPS127A mice group, which show a greater bone tumor volume. Sirius red staining of tumors biopsies reveals that overexpression of YAPS127A enhance the production of fibrillar collagens (Figure 5A). GSEA analysis unveiled that YAPS94A- and YAPS127A- cells are strongly enriched in ECM related-genes compared to mock-transfected cells (Figure 5B). These include fibrillar collagen genes such as COL1A1, COL1A2 and COL3A1 (Figures S4D and S5A). Interestingly, RNAseq analysis reveal that YAPS94A (not able to interact with TEAD) overexpression enhances the expression of several ECM genes suggesting that the ability of YAP to drive the expression of ECM genes does not depend exclusively on its interaction with TEAD (Figure 5B).

The process of bone tumor mineralization mainly depends on the expression of genes involved in the physiological bone remodeling process. In this context, RNAseq and RT-qPCR analysis reveal that YAPS94A overexpression enhances OPN, OPG, RANK and Runx2 (Figure 5C and Figure S5B) expression.

Several studies describe the involvement of the Wnt signaling pathway in bone remodeling, specifically in the differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts able to mineralize.

Furthermore, as studies also indicate that Hippo and Wnt signaling pathways are able to interact in order to regulate gene expression, we next examined the role of the Wnt/ β -catenin cascade in the ability of YAP to drive OS cells differentiation into cells able to mineralize. In situ PLA assays demonstrate an increase of Wnt3A-induced YAP- β -catenin interactions in the nucleus of both YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells, as compared to mock-transfected K-HOS cells (Figure 5D). In addition, YAPS94A and YAPS127A overexpression enhance the ability of Wnt3a to transactivate the TCF/LEF-specific reporter construct (TCF/LEF)₈-lux (Figure 5E) demonstrating the ability of YAP to drive Wnt/ β -catenin signalling pathway in OS cells. Interestingly, the specific inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway ICG-001 blocks the ability of both YAPS94A and YAPS127A mutated proteins to transactivate (TCF/LEF)₈-lux (Figure 5F). We next performed experiments to analyze the impact of mutated YAP proteins, YAPS94A and YAPS127A, on *in vitro* osteoblastic differentiation assays. As shown in Figure 5G, incubation of YAPS94A- or YAPS127A-overexpressed OS cells in monolayer cultures with osteogenic medium over 2 weeks leads in a marked increase in mineral deposition as revealed by Alizarin red staining in both conditions. This increase of mineral deposition is inhibited in the presence of ICG001, suggesting that YAP stimulates the mineralization process at least in part through its interactions with the Wnt/ β -catenin signaling pathway (Figure 5G).

Taken together, these results demonstrate that a) YAP drives the production of ECM genes such as fibrillar collagen, and b) Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a role in the YAP-driven OS mineralization process.

Verteporfin inhibits OS primary bone tumor and lung metastatic development.

To validate YAP signalling as a potential therapeutic target for OS treatment, we finally evaluated the effect of verteporfin, a Hippo/YAP inhibitor, on bone tumor growth and lung metastases development in the preclinical model of OS.

We first validated that verteporfin blocks the YAP/TEAD cascade as it inhibits transactivation of the TEAD-specific reporter construct (TEAD)₈-lux and the expression of Cyr61, a target gene of YAP/TEAD (Figure 6A). In addition, experiments using the preclinical experimental model of OS demonstrate that injection of verteporfin inhibits the OS tumor growth *in vivo* (Figure 6B). Indeed, 30 days after tumor cell injection, the bone tumor volume

is significantly decreased in mice treated with verteporfin. In this context, immunohistochemical staining for the proliferative marker Ki67 in mice tumor biopsies shows that verteporfin inhibits cell proliferation as compared with the untreated group (Figure 6C). In addition, *in vitro* assays demonstrate that verteporfin affects the cell viability of three OS cell lines, K-HOS, G292 and MG63 in a time and dose-dependent manners (Figure 6D).

Considering the metastatic process, the number of lung metastases is dramatically reduced in the verteporfin-treated mice group (Figure 6E). To have a better understanding, zymography assays demonstrate that verteporfin inhibits activation of HOS cells-secreted MMP-2 (Figure 6F). Since we demonstrated that TGF- β /Smad3 signalling pathway plays a crucial role in YAP-driven lung metastatic process in OS, we next examined the effect of verteporfin on the TGF- β /Smad3 cascade. Interestingly, verteporfin decreases the ability of TGF- β to transactivate the Smad3/4-specific reporter constructs (CAGA)₉-luc and -800PAI-luc (Figures 6G and 6H) and to increase the expression of two TGF- β /Smad3 target genes, PAI-1 and CTGF (Figure 6I).

Taken together, these results suggest that the Hippo/YAP signalling pathway could represent a therapeutic target against OS disease.

Discussion

Tumorigenesis is a long-term and multi-stage process that most often leads to the development of metastases. During this pathological course, two major events seem to be crucial: primary tumor growth and metastatic development. Concerning OS, the primary tumor grows foremost in the metaphysis of long bone and is inclined to distant metastases, with lungs as the most common site ^{283,284}. Despite that prognosis has been improved due to the application of chemotherapy protocols that mainly control primary growth tumor, the five-year survival rates of patients with lung metastasis remain dramatic ^{285–287}. Therefore, further exploration of the mechanisms underlying both tumor growth and lung metastasis seems to be of importance.

High YAP expression and/or YAP activation have been described in several solid tumor types and correlated with poor prognosis ^{257,276,288}. It has been proposed that YAP acts as an oncogene through activation of target genes that especially promote stimulation of proliferation, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and metastases development^{274,276,289}. Despite the emerging importance of YAP in many cancers, the exact mechanisms driving key functions in cancer progression still remain to be resolved. While YAP expression was reported in OS, the molecular mechanisms underlying tumor growth and lung metastatic development has not been established in this pathology.

In this work, we first demonstrate that YAP is highly expressed in biopsies from OS patients and confirm a previous study reporting that YAP expression predicts a poor prognosis in this pathology ²⁷⁸. Regarding the main role of TEAD transcriptional factor in YAP-driven genes expression, we further performed transcriptomic analysis in OS cells that identified TEAD-independent and TEAD-dependant modulation of YAP target genes in OS.

We also demonstrate the crucial role of YAP in the control of OS cell proliferation and tumor growth. Indeed, the overexpression of a constitutively active YAP (YAPS127A) promotes both the *in vitro* proliferation of OS cells and the *in vivo* growth of primary bone tumor. In several cancers, it has been demonstrated that YAP stimulates cell proliferation by mostly controlling the expression of a broad number of cell cycle regulators or the expression of oncogenes, for example MYC and AP-1 family members ^{276,288}. In this work, we identify genes directly involved in the control of cell cycle such as CCNA2, CCNB2, CCNE1 and CDC25B or involved in the

regulation of oncogene expression such as Gli1 previously described as a pro-proliferation factor and thus as a potential therapeutic target in OS²⁹⁰. Furthermore, using overexpression of a mutant YAP protein unable to interact with TEAD1-4 (YAPS94A), we clearly demonstrate that the transcriptional factors TEADs are crucial in YAP-driving OS growth both *in vitro* and *in vivo*. Reinforcing these results, TEAD1 is found highly expressed in OS patients and predicts a poor prognosis. Altogether with the previous observation that TEAD1 plays a crucial role in the regulation of OS cell proliferation²⁸⁰, these results strongly support the hypothesis that the YAP/TEAD axis could represent a promising target to inhibit primary OS tumor growth.

Considering that the growth of primary tumor is a first key step in tumorigenesis, the second step is the ability of tumor cells to acquire migratory capacities to develop metastases. In this work, overexpression of a YAP mutant protein able (YAPS127A) or not (YAPS94A) to interact with TEAD proteins in OS cells stimulate the development of *in vivo* lung metastases. A key issue of metastasis process is the EMT multi-step program promoting the migratory and invasive properties of cancer cells²⁹¹. During the last years, a crosstalk between the YAP cascade and EMT transcriptional factors such as ZEB1/2, Snail/Slug and Twist has been described in several carcinomas^{276,292}. Here, we clearly demonstrated that overexpression of YAP proteins, regardless of their ability to bind TEAD, stimulates the expression of the mesenchymal markers N-cadherin and vimentin, and the expression of the EMT transcriptional factors Snail and twist2, suggesting that TEADs are not fully necessary for the YAP-driving EMT-«like» process in OS. We can thus speculate that crosstalks between the YAP cascade and other signalling pathways widely implicated in EMT, such as TGF- β /Smad and/or Wnt/catenin cascades, drive EMT-«like» process in OS independently of YAP/TEAD interactions^{194,293}. Finally, functional assays revealed that YAP overexpression stimulates OS cell migration and MMP-2/9 activity, two MMPs implicated in tumor metastatic process such as in OS²⁹⁴ independently of TEAD binding.

Remodelling of actin cytoskeleton is clearly associated with the ability of cell to migrate and invade. In this context, many published works reported that YAP nuclear activity is correlated with the stability of actin cytoskeleton, mainly controlled by the RhoGTPase pathways^{295,296}. Here, we specifically demonstrate that the overexpression of YAP protein, regardless of their ability to bind TEAD, induces an OS cell pro-migratory phenotype associated with the expression of genes linked to both cell migration and focal adhesion assemblies such as THBS1.

We can speculate that an important subset of YAP transcriptional program is devoted to install a positive feedback loop that promotes actin remodelling and therefore stimulates migratory activity in OS in accordance with previous works demonstrating that YAP regulates cell migration by controlling focal adhesion assembly^{297–299}.

We thus we clearly demonstrated that overexpression of YAP proteins, regardless of their ability to bind TEAD, drive the ability of OS cell to migrate and thus stimulate the lung metastatic process.

It is now widely accepted that TGF- β acts both as a tumor suppressor in premalignant carcinoma and as a tumor promoter in advanced carcinoma¹⁹⁴. Regarding OS, we recently demonstrated that TGF- β only exerts pro-tumoral activities, specifically by stimulating the ability of OS cells to migrate and invade and thus by stimulating the development of pulmonary metastases¹⁹⁶. In this context, we made the hypothesis that YAP drives OS metastatic process via the TGF- β /Smad3 signalling pathway. We clearly demonstrated that blocking TGF- β /Smad3 cascade, by using the T β RI inhibitor SD-208, inhibits the ability of YAP protein to drive lung metastases development in OS, regardless of its binding to TEAD. One of the first studies describing the integration of YAP/TAZ and TGF- β signalling in nucleocytoplasmic shuttling, reported that TAZ interacts with Smad2/4 and Smad3/4 complexes in epithelial cells³⁰⁰. Similar findings were observed for YAP, which forms a complex with Smad3 in mesothelial cells³⁰¹ and in skin epithelial cells³⁰². Here, we clearly demonstrated that a YAP mutant protein not able to interact with TEAD (YAPS94A) interacts with Smad3 and therefore stimulates Smad3/4 transcriptional activity in OS. Notably, high levels of TEAD binding-incompetent YAP drastically enhance the ability of TGF- β to stimulate key functions implicated in the metastatic process such as cell migration. We further performed transcriptomic analysis in OS cells that allow to identify TEAD-independent modulation of YAP target genes associated with early and delayed TGF- β responsiveness including ECM genes. Interestingly, links between fibrosis and cancer via the Hippo/YAP pathway have been reported^{282,292,303}. Specifically, it is clear that the TGF- β and YAP signalling pathways work in concert to regulate ECM genes expression²⁸². For example, YAP deficient fibroblasts produce less ECM compounds upon TGF- β stimulation and express lower levels of myofibroblast markers such as α SMA as compared to normal fibroblasts³⁰⁴. Finally, interesting observation that strongly supports the crucial role of TGF- β /Smad3 in YAP-driving metastatic

process in OS, is that Smad3 is highly expressed in OS patients with metastases at diagnostic and is associated with poor survival outcomes.

One of the characteristics of bone tumors such as OS is the production of ECM able to mineralise. Here, we demonstrate that overexpression of YAP enhances the production of ECM both at gene and protein levels. We specifically demonstrate that overexpression of a mutant YAP protein unable to interact with TEAD (YAPS94A) stimulates the expression of Runx2 a transcriptional factor known to be involved in the differentiation of mesenchymal cells into functional osteoblasts³⁰⁵. As it is widely reported that the Wnt signaling pathway regulates bone remodeling²⁹³, we speculated that the Wnt/ β -catenin cascade is involved in this process. An abundance of studies demonstrated interactions between YAP and Wnt/ β -catenin pathways²⁸². Among them, it has been well established that Wnt stimulation promotes YAP nuclear accumulation and target genes transcription^{89,306}, and that YAP binds directly β -catenin⁸⁹. Here, we demonstrated that overexpression of a mutant YAP protein unable to interact with TEAD (YAPS94A) stimulates TCF/LEF transcriptional activity, suggesting that YAP/TEAD interactions are not required to stimulate Wnt/ β -catenin cascade in OS. Interestingly, an inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling pathway efficiently blocks the ability of YAP to drive the differentiation of OS cells in cells able to mineralize, suggesting the crucial role played by the Wnt/ β -catenin cascade in in this process.

To validate YAP as a potential therapeutic target in OS, we finally evaluated the effect of verteporfin on OS tumor growth and lung metastases development. Verteporfin, is a light-activated drug used in photodynamic therapy for the treatment of choroidal neovascular membranes³⁰⁷. We specifically demonstrate that verteporfin inhibits primary OS tumor growth. In this context, we show that verteporfin blocks in vitro cell proliferation and to induce in vitro cell apoptosis. In accordance with our results, verteporfin was subsequently reported to inhibit the growth of malignant cells without light activation such as in human glioma²⁵⁰. In addition, we report here that verteporfin inhibits lung metastases development and efficiently blocks the TGF- β /Smad3 transcriptional activity. Initially described as a YAP/TEAD interaction inhibitor³⁰⁷, verteporfin was interestingly recently described as able to induce the degradation of YAP protein, demonstrating that its capacity to target the YAP cascade via different modes of action²⁵³. We can thus speculate that verteporfin inhibits OS primary tumor growth via its ability either to block YAP/TEAD interaction or to degrade YAP protein,

and to inhibit lung metastases development via its ability to stimulate the degradation of YAP protein and therefore to inhibit YAP-driving TGF- β /Smad3 transcriptional activity.

The integration of several signalling pathways by a central actor within tumor cells represents an attractive strategy to treat both tumor growth and the metastatic process. Here, we specifically demonstrate that YAP is a central actor of both OS primary tumor growth and lung metastases development. Indeed, we demonstrated that depending on the transcription factor to which it will bind, YAP regulates key functions of tumor development. We propose that 1) during the first stages of tumorigenesis, YAP binds TEAD and drives key functions associated to primary tumor growth such as cell proliferation, and 2) during the late stages of tumorigenesis, YAP binds Smad3 and therefore drives key functions associated to the metastatic process, such as EMT, migration and invasion (Figure 7). We can speculate that this process is applicable to sarcoma and carcinoma. Specifically concerning osteosarcoma, we also demonstrated that YAP via the Wnt signalling pathway promotes the production of a mineralized matrix.

Legends

Figure 1: Elevation of Hippo gene expression in OS patients – Correlation between YAP expression and overall survival of OS patients.

A: Heatmap showing color-coded expression of Hippo target genes in OS tissue and matched normal tissue from the same OS patient following bioinformatics analysis of RNAseq data GSE99671 (Ho et al., 2017) from a cohort of 15 OS patients. High expression (red), low expression (blue).

B: Relative YAP gene expression in OS samples and matched normal tissues of the same patient following bioinformatics analysis of RNAseq data GSE99671 (Ho et al., 2017).

C: Kaplan-Meier analysis of the survival outcome of patients dichotomized into high level and low level of YAP, following analysis of the RNAseq dataset GSE42352 (Kuijjer et al., 2012) from an OS patient cohort comprising 88 samples. Analysis was performed using R2 (<http://r2.amc.nl>). P value is from log-rank tests.

Figure 2: Role of TEAD in YAP-driven OS cell proliferation and *in vivo* OS tumor growth - Correlation between TEAD1 gene expression and overall survival of OS patients.

A: Localization of endogenous YAP/TEAD1 complexes by *in situ* PLA in HOS cells. The red signal was obtained using Alexa555-labeled hybridization oligo nucleotides targeting amplified *in situ* PLA products. DAPI (blue) staining was used for nuclear visualization (left panel). Bars indicate means \pm SD of three independent experiments (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ right panel).

B: Schematic representation of the experimental protocols. Briefly, K-HOS cells were stably transfected with mock-, YAPS94A- or YAPS127A-vectors. Intramuscular paratibial injections of these cells were performed in nude mice and the tumor volume was measured twice a week. In parallel, RNAseq analysis were performed on cells.

C: YAP mRNA steady-state levels were quantified by RT-q-PCR analysis in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. Bars indicate means \pm SD of four independent experiments, each performed in duplicate (* $p < 0.05$, left panel). YAP production was detected

by Western Blot analysis in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. Results shown are representative of two independent experiments (right panel).

D: Localization of YAP/TEAD1 complexes by *in situ* PLA experiments in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. The red signal was obtained using Alexa555-labeled hybridization oligo nucleotides targeting amplified *in situ* PLA products. DAPI (blue) staining was used for nuclear visualization (left panel). Bars indicate means \pm S.D. of three independent experiments (** $p < 0.01$, right panel).

E: Mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected cells were transiently transfected with the TEAD-specific construct (TEAD)₈-lux. Bars indicate means \pm SD of four independent experiments, each performed in duplicate (* $p < 0.05$).

F: Real time proliferation assays were performed to compare the cell proliferation rate between mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS. Each point indicates means \pm SD of three independent experiments, each performed in sixuplicate (** $p < 0.01$).

G: Intramuscular paratibial injections of 1.10^6 mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells were performed in 3 groups of 12 nude mice. Tumor volumes were measured three times a week for 4 weeks (left panel). Means tumor volumes of each group 28 days after cell injection (middle panel, mean \pm SD; * $p < 0.05$, **** $p < 0.001$). Photographs of three representative bone tumors in each group of mice.

H: Heat map of YAP-associated upregulated gene signature in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. Color scales are based on Z-scores.

I: Heat map showing mRNA levels of 328 genes involved in the regulation of cell proliferation (left panel). Enrichment score (ES) plots of GSEA analysis show a significant upregulation of genes involved in cell proliferation in YAPS127A-transfected K-HOS cells compared to mock- and YAPS94A- transfected K-HOS cells (right panel). Color scales are based on Z-scores.

J: Total RNA was extracted from tumor biopsies of mice injected with mock-, YAPS94A- or YAPS127A-transfected cells. CCND1 mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate mean \pm S.D. (* $p < 0.05$).

K: Relative TEAD1 gene expression in OS patients and control samples of the same patients following bioinformatics analysis of RNAseq data GSE99671 (Ho et al., 2017) from a OS patient cohort comprising 15 samples.

L: Kaplan-Meier analysis of the survival outcome of patients dichotomized into high and low level of TEAD1 expression, following analysis of the RNAseq dataset GSE42352 (Kuijjer et al., 2012). Analysis was performed using R2 (<http://r2.amc.nl>). P value is from log-rank tests.

Figure 3: Role of YAP in OS cell migration and in vivo OS lung metastases development

A: Schematic representation of the experimental protocols. Briefly, K-HOS cells were transduced with mock-, YAPS94A- or YAPS127A-vector and stably selected. Intramuscular paratibial injections of these cells were performed in nude mice and the lung metastasis development was followed. In parallel, RNAseq analysis were performed on the YAP mutated cells.

B: Intramuscular paratibial injection of 1.10^6 mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells were performed in 3 groups of 12 nude mice. Number of lung metastases were counted 28 days after injection of the cells (left panel, mean \pm SD; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Photographs of representative Hematoxylin and Eosin staining of the lungs for each group (right panel). Bar=500 μ m.

C: Relative YAP gene expression in OS patients with or without metastases at diagnosis following bioinformatics analysis of RNAseq data seq GSE42352 (Kuijjer et al., 2012) from a OS patient cohort comprising 53 samples. Analysis was performed using R2 (<http://r2.amc.nl>).

D: Cultures of mock-, YAPS94A- and YAPS127A- transfected cells were fixed, permeabilized and stained with a monoclonal antibody directed against Vinculin (green). F-actin cytoskeleton and nuclei were respectively revealed by phalloidine (red) and DAPI labelling (blue).

E: Heat map showing mRNA levels of 203 genes involved in focal adhesion (left panel). Enrichment score (ES) plots of GSEA analysis show a significant upregulation of genes involves in focal adhesion in YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells compared to mock-transfected cells (right panel). Color scales are based on Z-scores.

F: N-cadherin, SNAIL, TWIST2 and vimentin mRNA steady-state levels were quantified by RT-qPCR analysis in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. Bars indicate the means \pm SD of three independent experiments, each performed in duplicate (* $p < 0.05$).

G: Real time migration assays using Xcelligence technology were performed to compare the cell proliferation rate between mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. Each point indicates the means \pm SD of three independent experiments, each performed in sixplicate (* $p < 0.05$).

H: Heat map showing mRNA levels of 184 genes involved in cell migration (left panel). Enrichment score (ES) plots of GSEA analysis show a significant upregulation of genes involved in cell migration in YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells compared to mock-transfected cells (right panel). Color scales are based on Z-scores.

I: MMP-2 and MMP-9 mRNA steady-state levels were quantified by RT-q-PCR analysis in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. Bars indicate means \pm S.D. of three independent experiments, each performed in duplicate (* $p < 0.05$).

J: Zymography analysis of conditioned media from 48 hours' serum-free cultures of YAPS127A-, YAPS94A- and mock-transfected K-HOS cells. A Coomassie blue stained gel representative of three independent experiments is shown (left panel).

Figure 4: Role of TGF- β /Smad3 in YAP-driven OS cell migration and *in vivo* OS metastatic process - Correlation between Smad3 gene expression and overall survival of OS patients.

A: Localization of endogenous YAP/Smad3 complexes by in situ PLA in HOS cells in presence or absence of TGF- β (5 ng/ml, 1h). The red signal was obtained using Alexa555-labeled hybridization oligo nucleotides targeting amplified in situ PLA products. DAPI (blue) staining was used for nuclear visualization (left panel). Bars indicate means \pm S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$, right panel).

B: HEK293 cells were co-transfected with YAPS94A-Flag, YAPS127A-Flag, Smad3-Myc or empty vectors as indicated. 24h after transfection, cells were treated with TGF- β (5 ng/mL during 1h) and then subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Flag antibody followed by Western blotting (WB) by YAP and Smad3 antibodies as indicated.

C: K-HOS cells were transfected with the Smad3/4-specific construct (CAGA)₉-lux and with or without YAPS94A-, YAPS127A-, or empty-vectors as indicated. 24h after transfection TGF- β (5 ng/ml) was added during another 24 h. Bars indicate means \pm SD of three independent experiments, each performed in duplicate (* p <0.05).

D: Localization of YAP/Smad3 complexes by in situ PLA in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-stably transfected K-HOS cells in the presence or absence of TGF- β (5 ng/ml during 1h). The red signal was obtained using Alexa555-labeled hybridization oligonucleotides targeting amplified in situ PLA products and DAPI (blue) staining was used for nuclear visualization (left panel). Bars indicate the means \pm SD of three independent experiments (* p <0.05, right panel).

E: YAPS94A-, YAPS127A-, or mock- stably transfected K-HOS cells were transfected with the Smad3/4-specific construct (CAGA)₉-lux. 24h after transfection TGF- β (5 ng/ml) was added during another 24 h. Bars indicate means \pm SD of three independent experiments, each performed in duplicate (* p < 0.05).

F: MMP-2 and MMP-9 mRNA steady-state levels were quantified by RT-q-PCR analysis in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells in the presence or absence of TGF- β (5 ng/ml during 6h, 12h, 24h and 48h). Bars indicate the means \pm SD of three independent experiments, each performed in duplicate.

G: Zymography analysis of conditioned media from 48 hours serum-free cultures of YAPS127A-, YAPS94A- and mock-transfected K-HOS cells in the presence or absence of TGF- β (5 ng/ml). A Coomassie blue stained gel representative of three independent experiments is shown (left panel). Quantification of relative MMP-2 and MMP-9 activities (middle and right panels). Bars indicate the means \pm SD of three independent experiments (* p < 0.05).

H: Heat map showing mRNA levels of early TGF- β response genes (left panel) or delayed TGF- β response genes (right panel). Enrichment score (ES) plots of GSEA analysis show a significant upregulation of TGF- β response genes involved in YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells compared to mock-transfected cells. Color scales are based on Z-scores.

I: Intramuscular paratibial injections of 1.10^6 mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells were performed in 6 groups of 10 nude mice and treated with vehicle or SD-208

(60 mg/kg/day) as indicated. Mice were sacrificed when tumor sizes reached 1000 mm³ and lungs were removed. Number of lung metastases (left panel, mean \pm SD; * p < 0.05, ** p <0.01). Representatives Hematoxylin and Eosin staining of representative lungs for each group (right panel). Bar=500 μ m.

J: Relative Smad3 gene expression in OS patients with or without metastases at diagnosis following bioinformatics analysis of RNAseq data seq GSE42352 (Kuijjer et al., 2012) from an OS patient cohort comprising 53 samples. Analysis was performed using R2 (<http://r2.amc.nl>)

K: Kaplan-Meier analysis of the survival outcomes of 51 patients dichotomized into high level and low level of YAP expression, following analysis of the RNAseq dataset GSE42352 (Kuijjer et al., 2012). Analysis was performed using R2 (<http://r2.amc.nl>).

Figure 5: Role of the Wnt cascade in YAP-driven OS cell mineralization

A: Intramuscular paratibial injections of 1.10⁶ mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells were performed in 3 groups of 10 nude mice. 28 days after cell injection, mice were sacrificed, and the OS bone tumors were observed. Photographs of representative bone tumors for each group. Sirius Red staining and Masson's Trichrome staining were performed. Bar=500 μ m.

B: Heat map showing mRNA levels of 126 genes involved in the regulation of ECM production (left panel). Enrichment score (ES) plots of GSEA analysis show a significant upregulation of genes involved in ECM production in YAPS127A- and YAPS94-transfected K-HOS cells compared to mock-transfected cells (right panel). Color scales are based on Z-scores.

C: OPN, OPG, RANK and Runx2 mRNA steady-state levels were quantified by RT-qPCR analysis in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. Bars indicate means \pm SD of three independent experiments, each performed in duplicate (* p <0.05, ** p < 0.01, *** p <p 0.001).

D: Localization of YAP/ β catenin complexes by in situ PLA in in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-stably transfected K-HOS cells in the presence or absence of Wnt3a (25 ng/ml during 1h). The red signal was obtained using Alexa555-labeled hybridization oligonucleotides targeting amplified in situ PLA products and DAPI (blue) staining was used for nuclear

visualization (left panel). Bars indicate the means \pm SD of three independent experiments (* p <0.05, right panel).

E: Mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells were transfected with the TCF/LEF construct (TCF/LEF)₈-lux, in the presence or absence of Wnt3a (25 ng/mL, left panel) or ICG-001 (10 μ M, right panel). Bars indicate the means \pm SD of four independent experiments, each performed in duplicate (* p <0.05, ** p <0.01). **F:** Mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells were transfected with the TCF/LEF construct (TCF/LEF)₈-lux, in the presence or absence of Wnt3a (25 ng/mL) or ICG-001 (10 μ M) as indicated. Bars indicate the means \pm SD of four independent experiments, each performed in duplicate (* p <0.05).

G: Mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells were cultured in the presence or absence of osteogenic medium up to 5 days, and in presence or absence of ICG-001 (10 μ M). Cultures were then fixed and stained with Alizarin Red S. Results show one representative experiment of two independent experiments (left panel). Bars indicate mean \pm SD of two independent experiments performed in duplicate (* p <0.05, ** p < 0.01, right panel).

Figure 6: Verteporfin inhibits OS primary bone tumor and lung metastatic development.

A: HOS Cells were transfected with the TEAD-specific construct (TEAD)₈-lux. 24h after transfection, cells were treated with Verteporfin at indicated concentration during 24h. Bars indicate means \pm S.D. of four independent experiments, each performed in duplicate (left panel, ** p <0.01, *** P < 0.001). Cyr61 mRNA steady-state levels were quantified by RT-q-PCR analysis in the presence or absence of verteporfin (1, 2, 5 μ M during 24h). Bars indicate the means \pm SD of three independent experiments, each performed in duplicate (* p <0.05, right panel).

B: Intramuscular paratibial injections of 1.10^6 HOS cells were performed in 2 groups of 12 nude mice treated with vehicle or verteporfin (20 mg/kg/day) as indicated. Tumors volumes were measured 3 times a week for 4 weeks (Mean \pm SEM; *** p <0.001).

C: Tumor samples (tumor sizes at 2000 mm³) were fixed, embedded in paraffin, sectioned and stained with Ki-67. Representative photomicrographs per group are shown. Histogram

represents the mean percentage of Ki-67 positive cells in each group of mice. (Mean \pm SEM; *** $p < 0.001$).

D: HOS, MG63 and G292 OS cell lines were treated with verteporfin as indicated for 24h (left panel) or 48h (right panel). After incubation, cell viability was evaluated by cell counting. For each cell line, graph indicates the mean percentage of cell viability compared to untreated cells. Mean \pm S.D. of three independent experiments, each performed in sixplicate.

E: Intramuscular paratibial injections of 1.10^6 HOS cells were performed in 2 groups of 12 nude mice treated with vehicle or verteporfin (20 mg/kg/day) as indicated. Mice were sacrificed when tumor sizes reached 2000 mm³ and lungs were removed. Number of lung metastases (mean \pm SD; *** $p < 0.001$).

F: Zymography analysis of conditioned media from 48 h serum-free cultures of HOS cells treated with verteporfin as indicated (VP). A Coomassie blue stained gel representative of three independent experiments is shown.

G: HOS cells were transfected with the Smad3/4-specific construct (CAGA)₉-lux. 24h after transfection, cells were treated during 24 hours with or without verteporfin as indicated and were treated or not with TGF- β (5 ng/ml, 24 hours). Bars indicate mean \pm S.D. of at least three independent experiments carried out in triplicate (* $p < 0.05$, *** $p < 0.005$).

H: HOS cells were transfected with the -800PAI-1-lux construct mutated (-800mutPAI-1-lux) or not (-800PAI-1-lux) on CAGA sequences (-800mutPAI-1-lux). 24h after transfection, cells were treated during 24 hours with verteporfin as indicated and with or without TGF- β (5 ng/ml, 24 hours). Bars indicate mean \pm S.D. of at least three independent experiments carried out in triplicate (* $p < 0.05$).

I: HOS cells were pretreated for 24 hours verteporfin as indicated and were treated or not with TGF- β (5 ng/ml, 6h or 48h). After incubations, mRNA steady-state levels of the specific TGF- β target genes *CTGF* (6h) and *PAI-1* (48h) were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate means \pm S.D. of at least three independent experiments, each performed in triplicate (* $p < 0.05$).

Figure 7: Verteporfin inhibits OS primary bone tumor and lung metastatic development.

Supplementary Figures

Sup Figure 1: Elevation of Hippo gene expression in OS patients

A: GSEA showing a Hippo signature in OS samples following bioinformatics analysis of RNAseq data GSE99671 (Ho et al., 2012) from an OS patient's cohort comprising 15 samples. FDR false discovery rate, NES normalized enrichment score

B: Relative Cyr61, THBS1, PAI-1 and BIRC5 genes expression in OS patient and control samples following bioinformatics analysis of RNAseq data GSE99671 (Ho et al., 2012).

Sup Figure 2: Role of TEAD in YAP-driven OS cell proliferation and in vivo OS tumor growth.

A: Localization of endogenous YAP/TEAD1 complexes by in situ PLA in MG63 and G292 OS cells. The red signal was obtained using Alexa555-labeled hybridization oligo nucleotides targeting amplified in situ PLA products. DAPI (blue) staining was used for nuclear visualization. Bars indicate means \pm S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

B: HEK293 were transiently co-transfected with the YAP-S94A, YAP-S127A, TEAD1 or empty vector as indicated. 48h after transfection lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with anti-Flag antibody followed by Western blotting (WB) by anti-Flag and anti-HA antibodies as indicated.

C: HOS, MG63 or G292 cells were co-transfected with the TEAD-specific construct (TEAD)₈-lux with or without empty, YAPS94A and YAPS127A expression vectors. Bars indicate means \pm SD of four independent experiments, each performed in triplicate (** $p < 0.01$).

D: Cells were treated with thymidine (2 mM) during 24h and released from thymidine block by PBS wash. 10h after, cell cycle distribution of mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected cells were analyzed by propidium-iodide staining and flow cytometry.

E: PCA analysis was done to evaluate data reproducibility among replicates and to summarize genome-wide transcriptional effect of transfections.

F: Volcano plot of genes differentially expressed (FDR < 0.05) in YAPS94A- vs mock-, and YAPS127A- vs mock-transfected cells.

G: Heatmap of all the significantly differentially expressed genes is plotted (YAPS94A- vs mock-transfected cells, YAPS127A- vs mock-transfected cells and YAPS127A- vs mock-transfected cells). Colour scales are based on Z-scores.

H: CCND1, Gli1 and AKT mRNA steady-state levels were quantified by RT-qPCR analysis in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells. Bars indicate means \pm SD of three independent experiments, each performed in triplicate (* p <0.05).

I: RNA was extracted from tumor biopsies of mice injected with mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected K-HOS cells, Gli1 and AKT mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate mean \pm S.D. of three independent experiments carried out in triplicate (* p <0.05).

Sup Figure 3: Role of YAP in the control of cell migration

A: Median Log₂(FPKM) expression of RHOC, RHOD, THBS1 and CXCR4 between mock-, YAPS94A- and YAPS127A- transfected cells following bioinformatics analysis of RNA sequencing.

B: Median Log₂(FPKM) expression of twist2 and Snail genes expression in mock-, YAPS94A- and YAPS127A- transfected cells following bioinformatics analysis of RNA sequencing.

Sup Figure 4: Role of TGF- β /Smad3 in YAP-driven OS cell migration and *in vivo* OS metastatic process.

A: Localization of endogenous YAP/Smad3 complexes by in situ PLA in MG63 and G292 cells in presence or absence of TGF- β (5 ng/ml during 1h). The red signal was obtained using Alexa555-labeled hybridization oligo nucleotides targeting amplified in situ PLA products.

DAPI (blue) staining was used for nuclear visualization (left panel). Bars indicate means \pm S.D. of three independent experiments (*P < 0.05, **P < 0.01).

B: MG63 and G292 cells were co-transfected with the Smad3/4-specific construct (CAGA)₉-lux and either the YAPS94A, YAPS127A, or empty vectors. 24h after transfection TGF- β (5 ng/ml) was added during 24h. Bars indicate means \pm S.D. of three independent experiments, each performed in triplicate (*p < 0.05).

C: VEGF α and PDGF β mRNA steady-state levels were quantified by RT-q-PCR analysis in mock-, YAP-S94A- and YAP-S127A-transfected HOS cells in presence or absence of TGF- β (5 ng/ml during 1h or 6h). Bars indicate means \pm S.D. of three independent experiments, each performed in duplicate.

D: Median Log₂(FPKM) expression of COL1A1, MMP1, PAI-1, MMP-2, MMP-9 THSB1, LAMA2 and LAMA4 genes expression in mock-, YAPS94A- and YAPS127A-transfected cells following bioinformatics analysis of RNA sequencing.

E: COL1A1, CXCR4, MMP-1 and LAMA2 mRNA steady-state levels were quantified by RT-q-PCR analysis in mock-, YAP-S94A- and YAP-S127A-transfected HOS cells. Bars indicate mean \pm S.D. of three independent experiments carried out in triplicate.

F: Cells were transfected with the Smad3/4-specific construct (CAGA)₉-lux. 24h after transfection TGF- β (5 ng/ml) was added during 24h in presence or absence of SD-208 (10 ng/ml) for another 24 h. Bars indicate means \pm S.D. of three independent experiments, each performed in triplicate (*p < 0.05).

Sup Figure 5: Role of the Wnt cascade in YAP-driven OS cell mineralization

Median Log₂(FPKM) expression of (A) Col1A2, Col3A1 and (B) Runx2, OPG and OPN between mock-, YAPS94A- and YAPS127A- transfected cells following bioinformatics analysis of RNA sequencing.

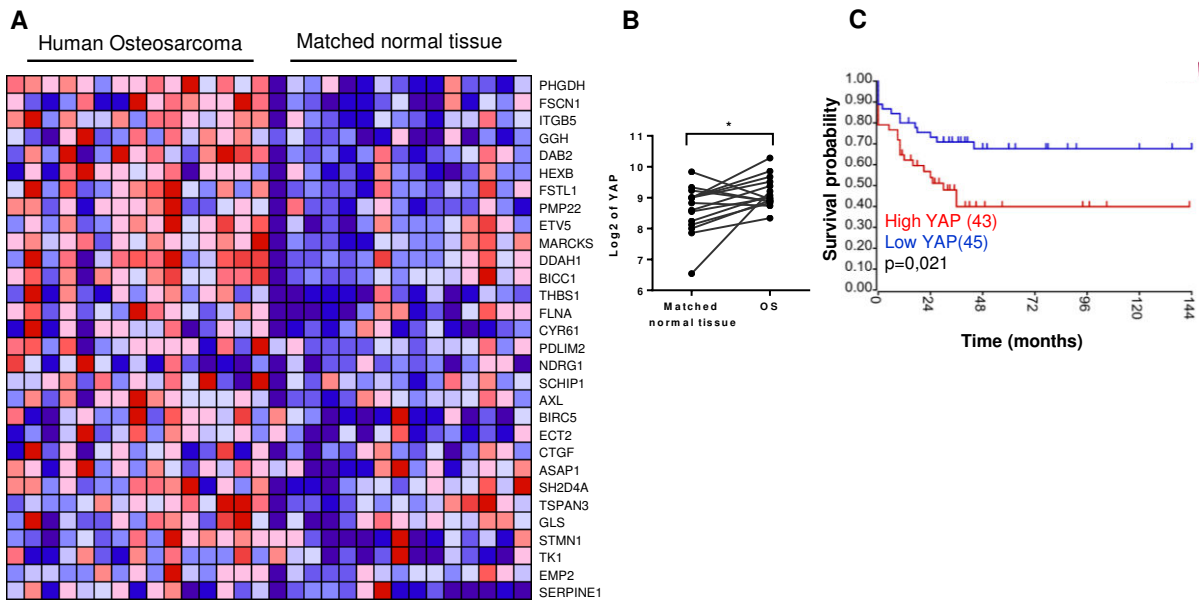


Figure 1: Elevation of Hippo gene expression in OS patients – Correlation between YAP expression and overall survival of OS patients.

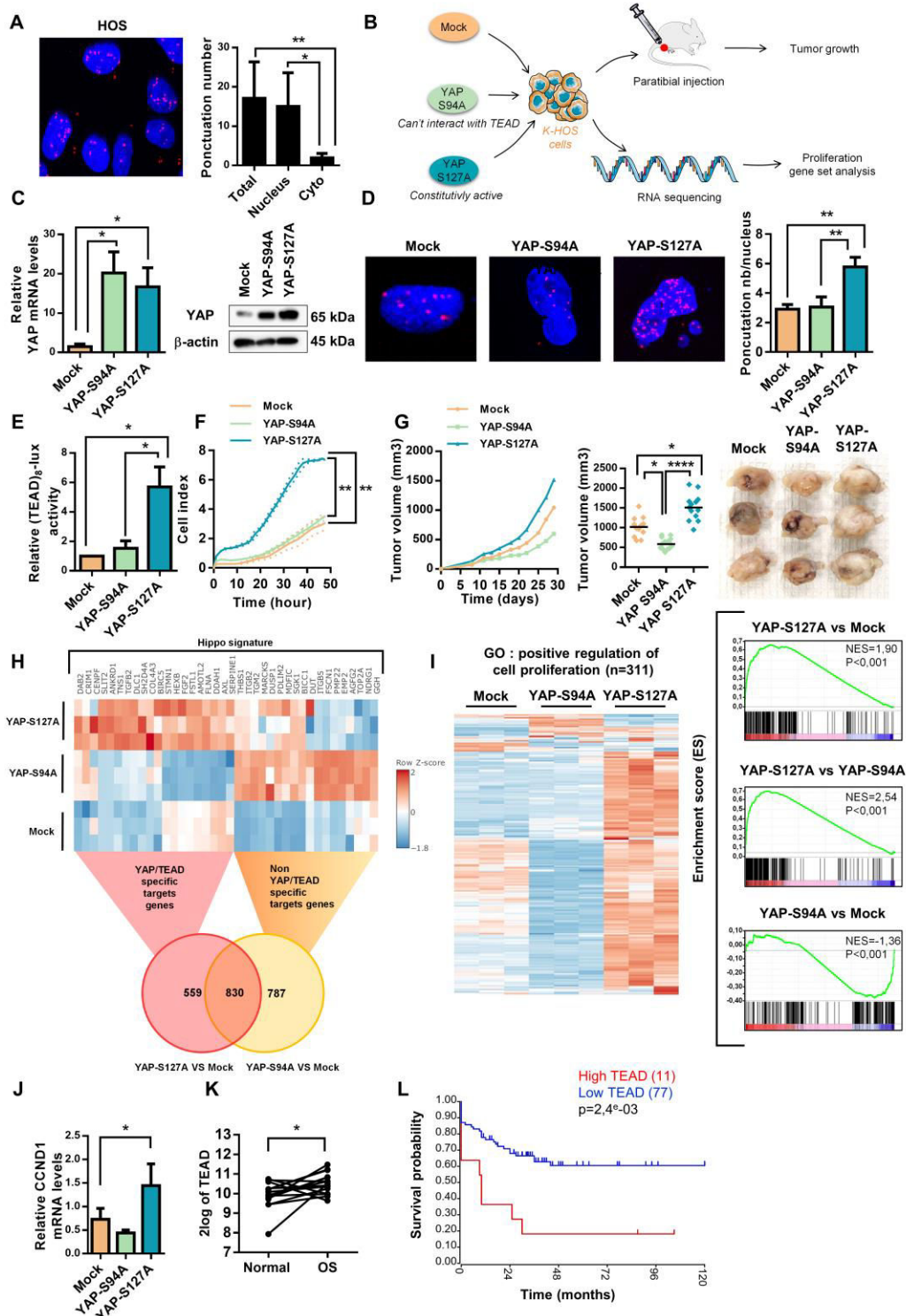


Figure 2: Role of TEAD in YAP-driven OS cell proliferation and *in vivo* OS tumor growth - Correlation between TEAD1 gene expression and overall survival of OS patients.

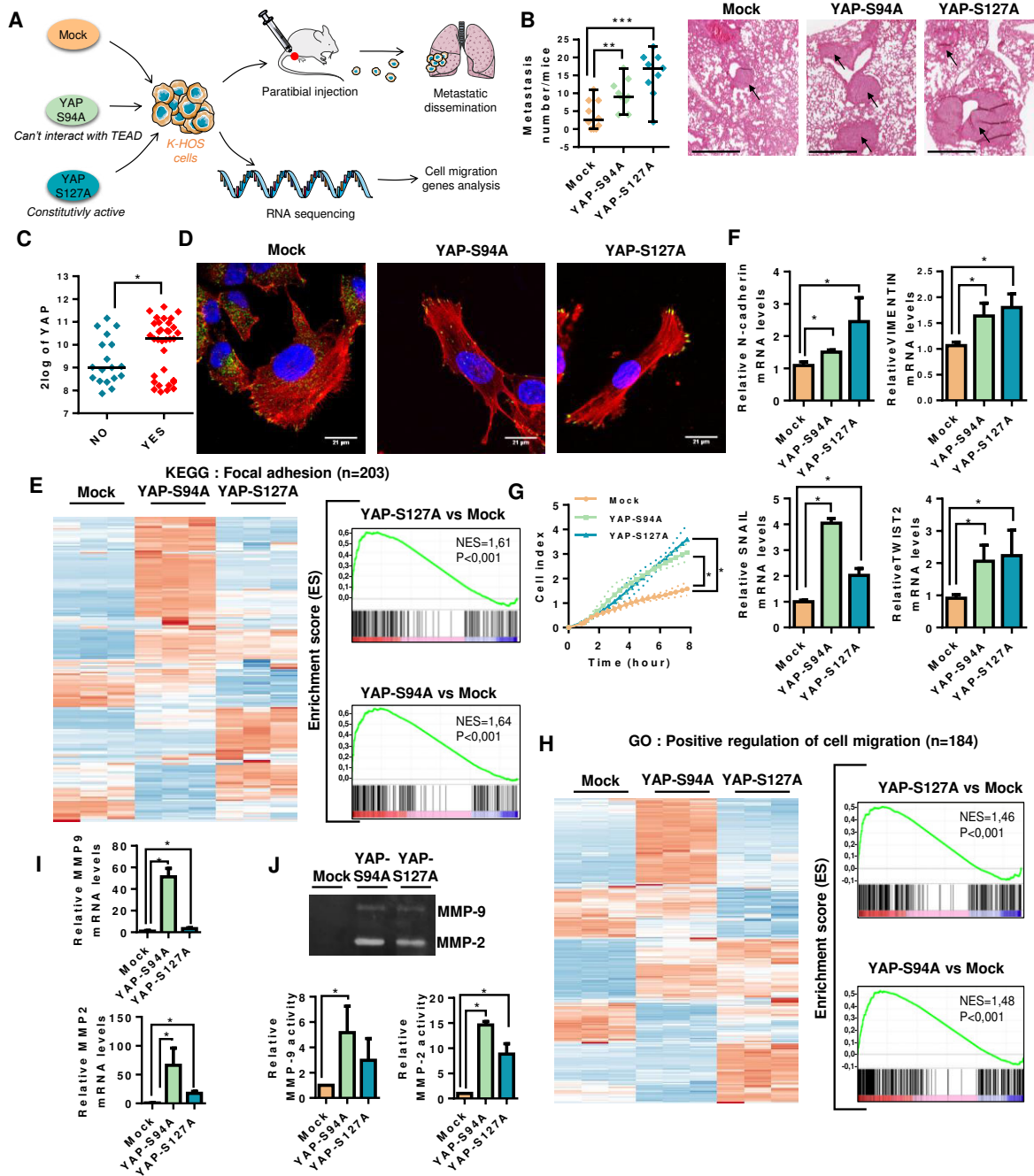


Figure 3: Role of YAP in OS cell migration and in vivo OS lung metastases development

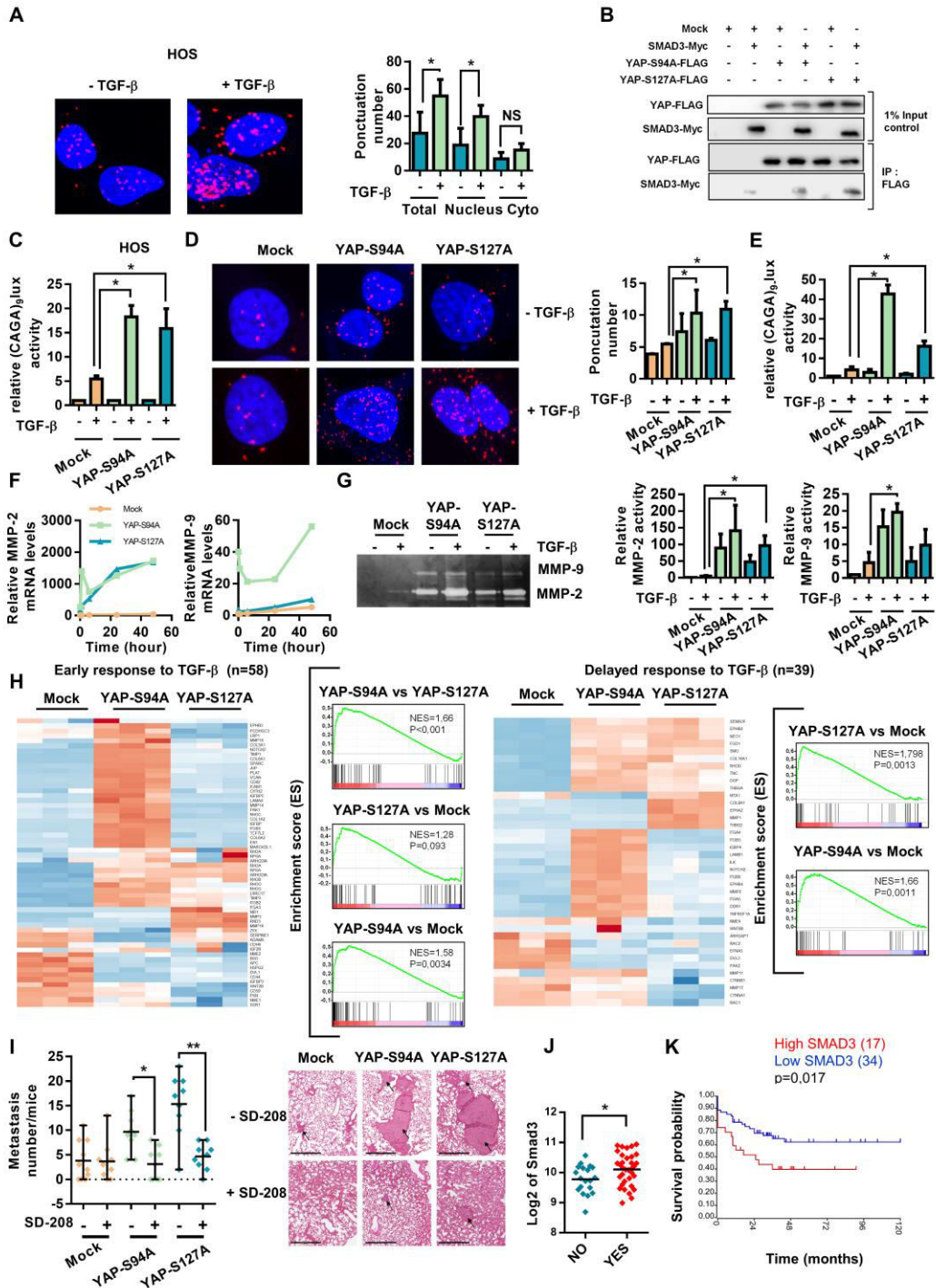


Figure 4: Role of TGF- β /Smad3 in YAP-driven OS cell migration and *in vivo* OS metastatic process - Correlation between Smad3 gene expression and overall survival of OS patients.

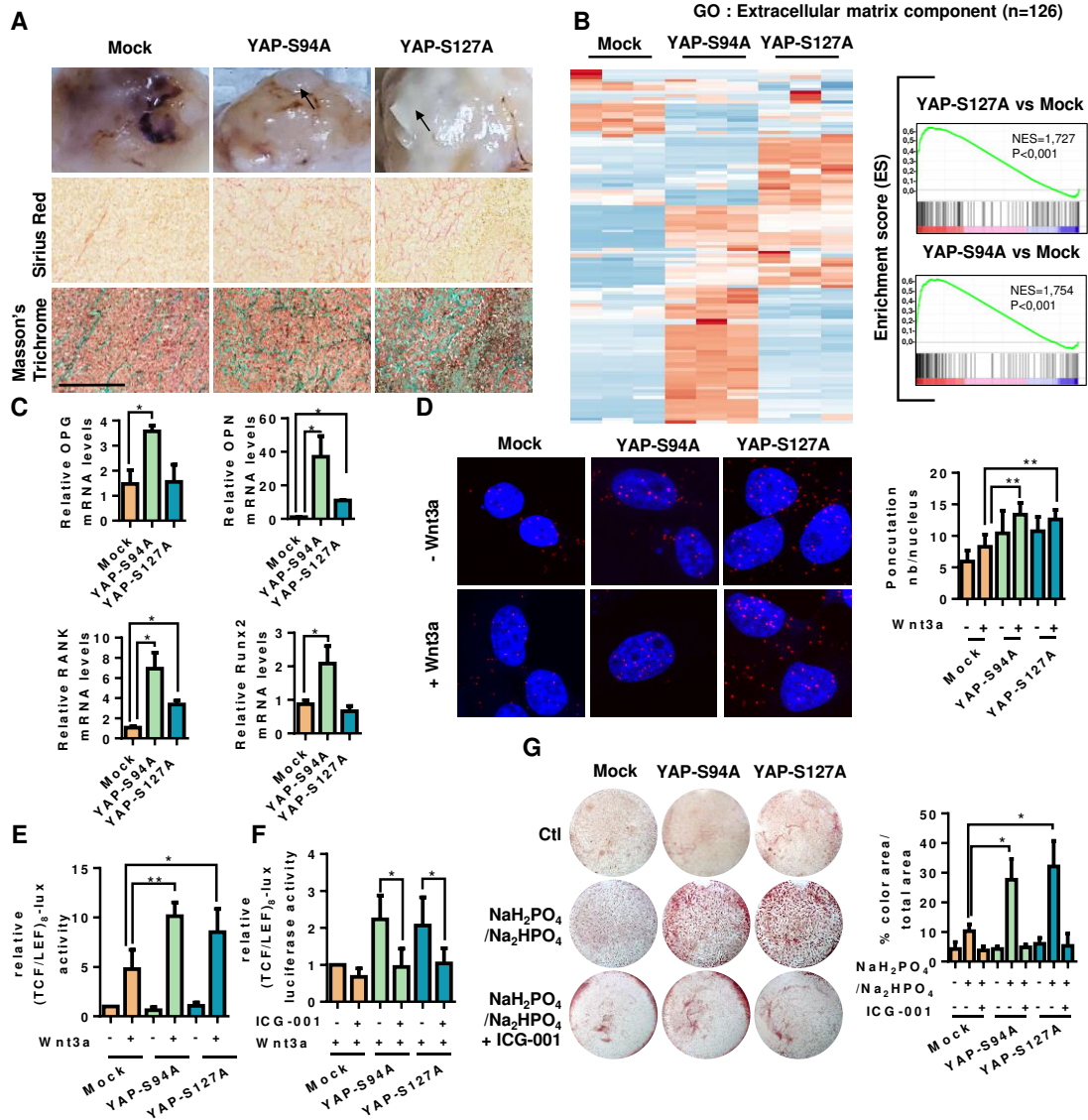


Figure 5: Role of the Wnt cascade in YAP-driven OS cell mineralization

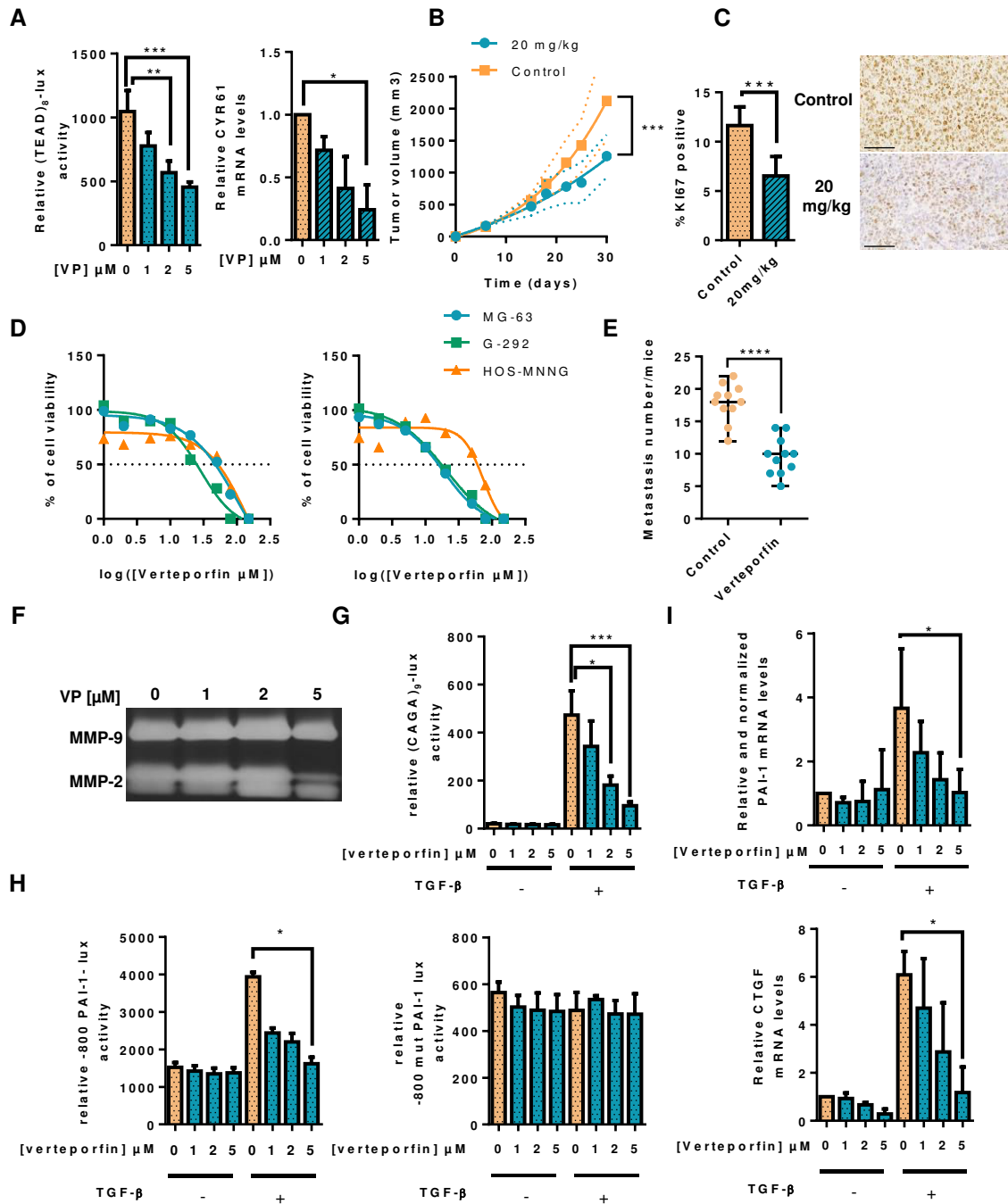


Figure 6: Verteporfin inhibits OS primary bone tumor and lung metastatic development.

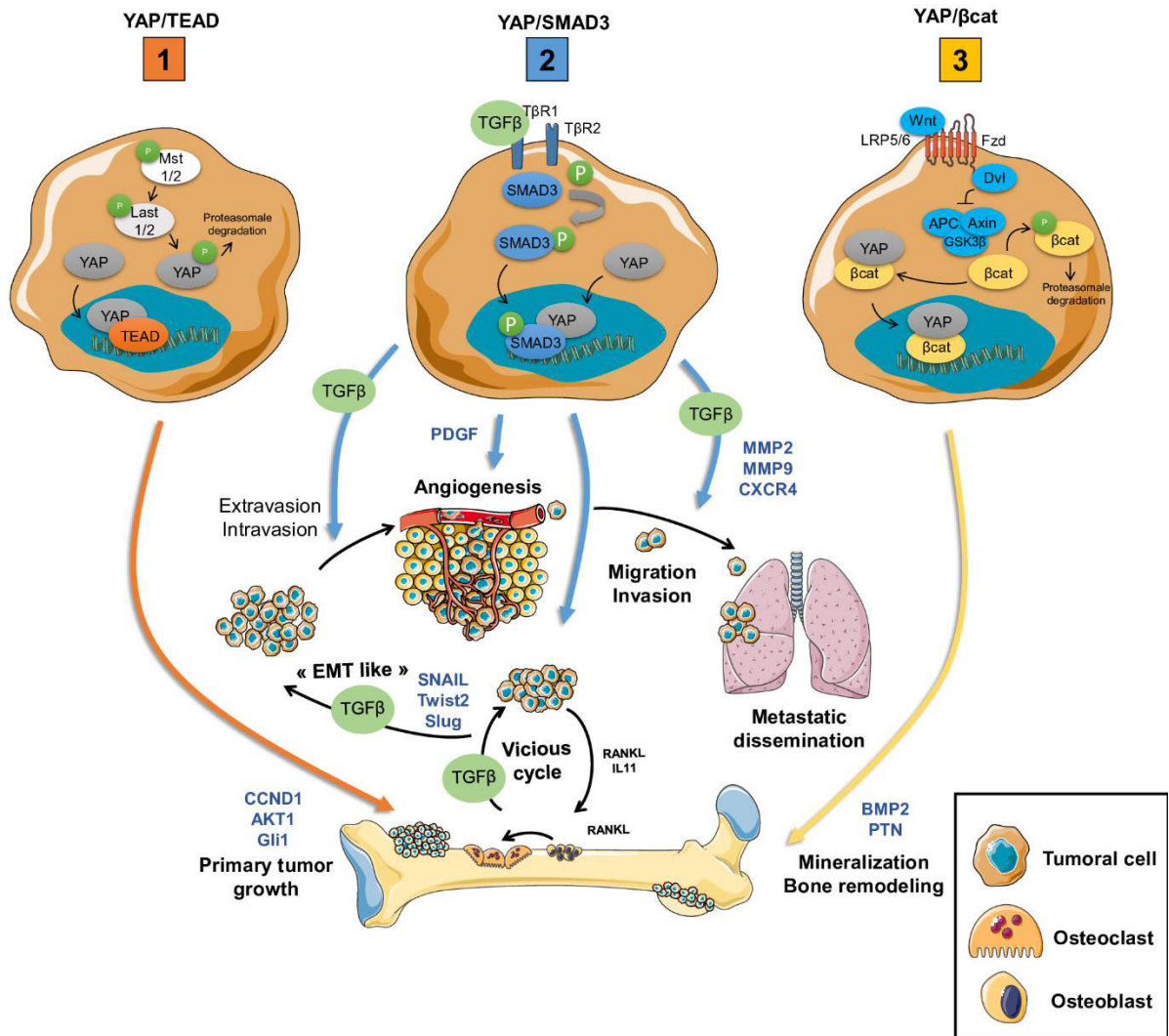
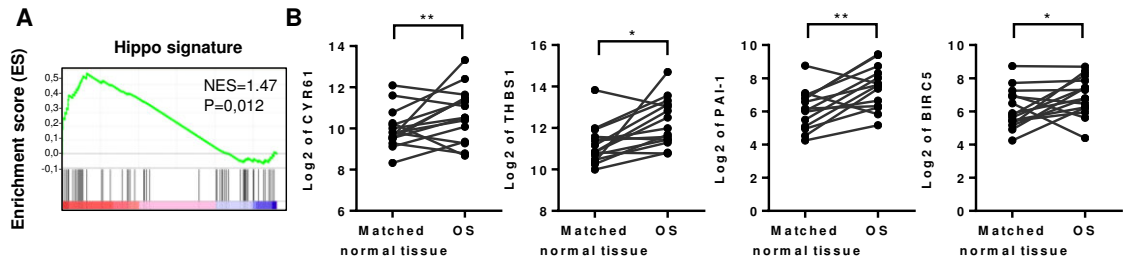
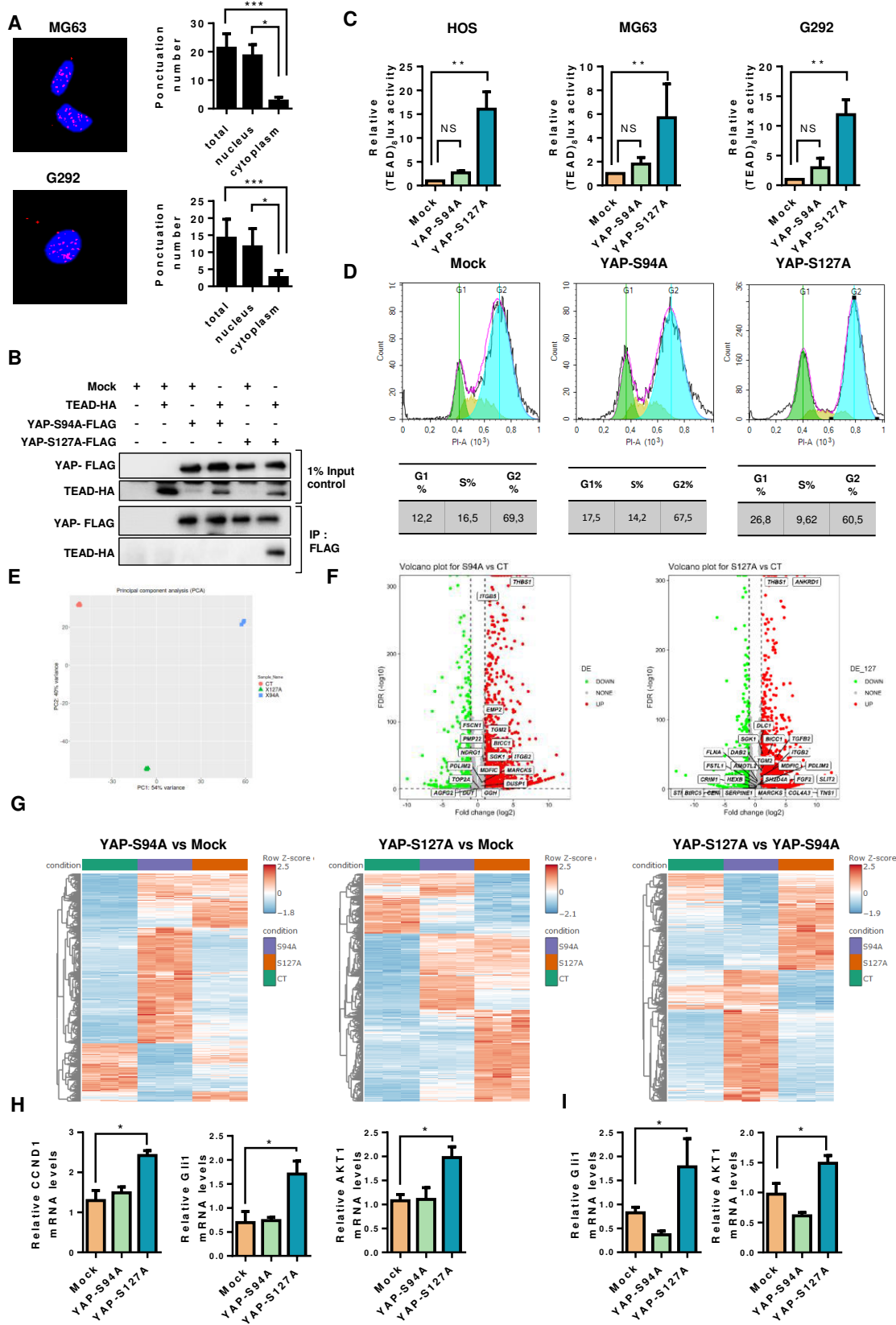


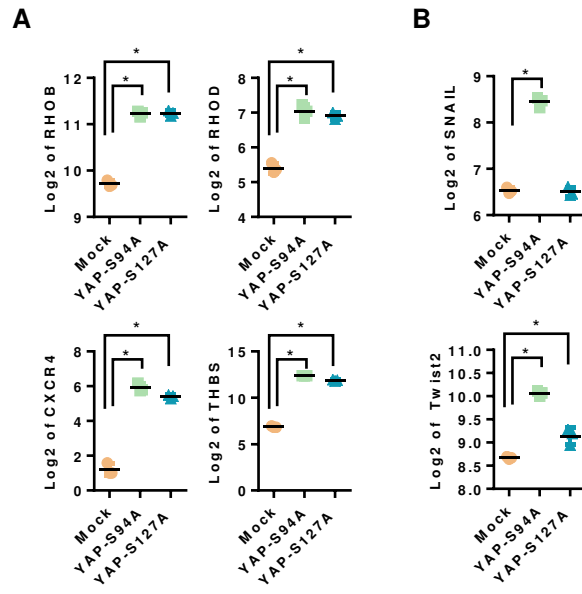
Figure 7: Model depicting the proposed mechanism of YAP-Mediated regulation of osteosarcoma progression



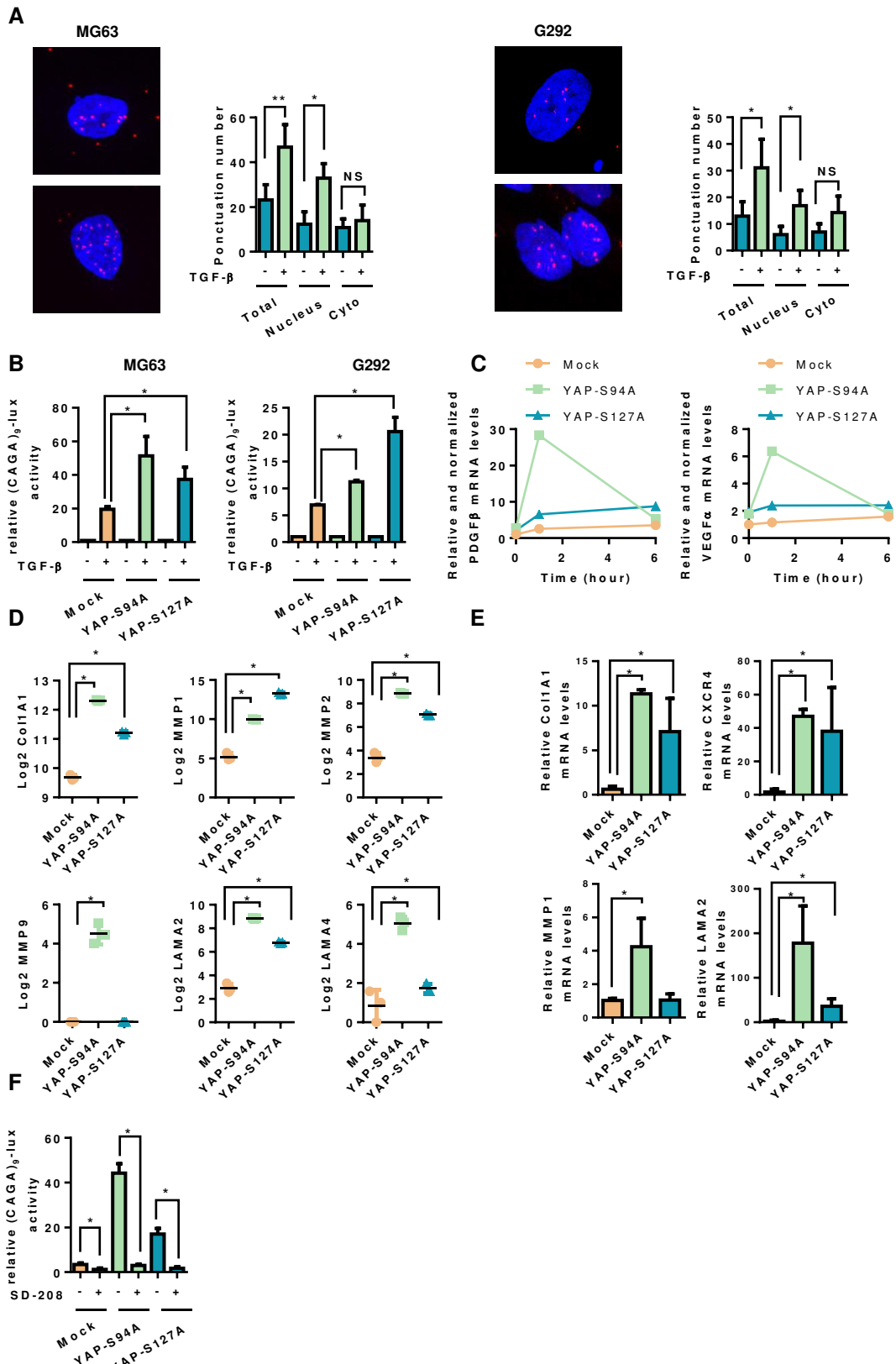
Sup Figure 1: Elevation of Hippo gene expression in OS patients



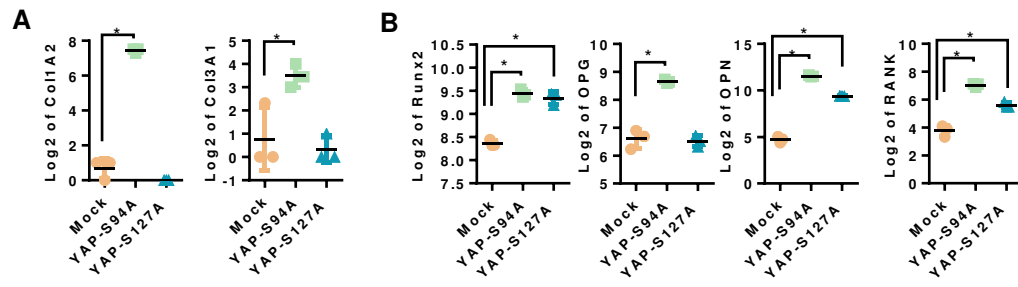
Sup Figure 2: Role of TEAD in YAP-driven OS cell proliferation and in vivo OS tumor growth.



Sup Figure 3: Role of YAP in the control of cell migration



Sup Figure 4: Role of TGF-β/Smad3 in YAP-driven OS cell migration and in vivo OS metastatic process.



Sup Figure 5: Role of the Wnt cascade in YAP-driven OS cell mineralization

METHODS

Osteosarcoma mouse model

Four-week-old female Rj:NMRI-nude mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were maintained under pathogen-free conditions at the Experimental Therapy Unit (Faculty of Medicine, Nantes, France) in accordance with the institutional guidelines of the French Ethical Committee (CEEA Pays de la Loire n°06 : project authorization 8405). Mice were anesthetized by inhalation of isoflurane before receiving an intramuscular injection of 1.10^6 K-HOS parental or mutant cells in close proximity to the tibia. Concerning *in vivo* experiments using the inhibitor verteporfin, 5 days after cell injections, groups of mice received the molecule (20 mg/kg) or control vehicle (DMSO in saline) twice a week by intraperitoneal injection. The tumor volume (V) was calculated from the measurement of three perpendicular diameters using a calliper, according to the following formula: $V = (\text{length} \times \text{height} \times \text{depth})/2$. Mice were sacrificed when the tumor volume reached 2500 mm³ for ethical considerations. Note that lung metastases were analysed and counted when the tumor volumes were equal to 1000 mm³ in each group of mice.

Cell culture and reagents.

K-HOS (CRL-1544), HOS-MNNG (CRL-1543), MG-63 (CRL-1427) and G292 (CRL-1423) osteosarcoma cell lines were purchased from ATCC (LGC Standards, Molsheim, France). HEK293 cells were purchased from Invitrogen (ThermoFisher, Courtaboeuf, France). Cells were cultured in high glucose DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Hyclone Perbio, Bezons, France).

To generate mutant YAP-S94A and YAP-S127A expressing cells, retrovirus infection was performed by transfecting 293 Phoenix retrovirus packaging cells with empty vector, pQCXIH-Myc-YAP-S94A and pQCXIH-Flag-YAP-S127A. pQCXIH-Myc-YAP-S94A and pQCXIH-Flag-YAP-S127A were gifts from Kunliang Guan (respectively Addgene plasmid #33094 and #33092 ; <http://n2t.net/addgene:33094> and 33092; RRID:Addgene-33094 and -33092). pQCXIH CMV/TO DEST (w382-1) was a gift from Eric Campeau and Paul Kaufman (Addgene plasmid #17394; <http://n2t.net/addgene:17394>; RRID:Addgene-17394). Twenty-four hours post-transfection, retroviral supernatant was supplemented with 5 µg/ml polybrene (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), filtered

through a 0.45- μ m filter, and used to infect K-HOS cells. Forty-eight hours after infection, cells were selected with 200 μ g/ml hygromycin-B (Invitrogen, Courtaboeuf, France).

Verteporfin was purchased from Tocris (Bristol, UK), and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) at 10 mM. For *in vivo* experiments, verteporfin was first dissolved in DMSO and further diluted in saline medium at a maximal dose of 2% DMSO v/v. TGF- β 1 were purchased from R&D System, Inc (Minneapolis, MN).

Luciferase reporter assay and plasmid constructs.

Transient cell transfections were performed with jetPEI™ (Polyplus transfection, Illkirch, France). The pRLTK-Renilla luciferase expression vector was co-transfected in all experiments to monitor transfection efficiencies. Luciferase activity was determined with the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Charbonnières, France). The (CAGA)₉-Lux (55), 8xGTIIC-Luc (gift from Stefano Piccolo, Addgene plasmid #34615; <http://n2t.net/addgene:34615>; RRID:Addgene-34615, (TEAD)₈-lux in the text) and the M50 Super 8xTOPFlash (gift from Randall Moon, Addgene plasmid #12456; <http://n2t.net/addgene:12456>; RRID:Addgene-12456, (TCF/LEF)₈-lux in the text) constructs were respectively used as specific reporter constructs specific for Smad3/4-, TEAD- and TCF/LEF-driven signalling.

Real time proliferation assay

In vitro cell proliferation assays were assessed using xCELLigence Real-Time cell-Analyzer (ACEA Biosciences, San Diego, CA). 5x10³ OS cells were seeded in a 96-well microelectronic cell sensor system plate. The plate was insert into the xCELLigence RTCA proliferation instrument. Cell growth was analysed during 96h. The dimensionless cell index (CI), derived as a relative change in measured electrical impedance caused by proliferative cells. The experiment was done in triplicate and repeated 3 times.

Real time migration assay

OS cell migration was assessed using xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences) using an electronically integrated Boyden chamber (CIM-Plate® 16). 30×10^3 OS cells were seeded in CIM-Plate® 16, migration was measured during 24h, the experiment was run in triplicate and repeated 3 times.

Histologic analysis and immunohistochemistry

Tumor tissues were embedded in paraffin and 3- μ m sections were cut and stained for Ki-67 using Ki-67 antibody (Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands). Immunodetection was performed using DAB Substrate-Chromogen (Agilent Dako, Santa Clara, CA) and counterstained with haematoxylin. Quantification of relative Ki-67 positive cells was evaluated by ImageJ (NIH, Bethesda, MD) software. Lungs were fixed in 10% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Lung sections (3 μ m-thick) were mounted on glass slides and stained with hematoxylin-eosin (HE). OS bone tumors were fixed in 10% buffered formaldehyde and embedded in paraffin.

RNA extraction and Real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from cells and tumors using NucleoSpin®RNAplus (Macherey Nagel, Duren, Germany). Total RNA was reverse transcribed using the Maxima H minus first stand cDNA synthesis kit (ThermoFisher, Courtaboeuf, France). Realtime monitoring of PCR amplification of complementary DNA was performed using DNA primers (primers sequences are available in Table 1) using QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher, Courtaboeuf, France) with SYBR® Select Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA). Target gene expression was normalized to glyceraldehyde 3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) and β -actin (ACTB) levels in respective samples as an internal standard.

Gelatin zymography assay

Cells were cultured without serum for 48h and conditioned media were analyzed by gelatin zymography in 10% polyacrylamide gels containing 1 mg/ml gelatin (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) as described previously (Lamora et al., 2015).

Western blot analysis

Cells were lysed in lysis buffer (SDS 1%, Tris pH 7.4 10mM, Sodium orthovanadate 1 mM) and protein concentration was determined using the BCA Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). Samples in Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue) containing equal amounts of total protein extracts were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and transferred to PVDF Transfer membrane (Thermo scientific, Illkirch, France). Antibody used for western blotting were: YAP1 (1:8000; proteintech, 1358-AP), anti-Flag (1:1000, sigma Aldrich, F1804), myc-tag (1:1000, cell signalling, 2276), HA-tag (1:500; cell signalling, 2367), β -actin (1:1000; cell signalling, 8457), anti-mouse IgG-HRP (1:10000, Santa Cruz Biotechnology, sc-2314) and anti-rabbit IgG-HRP (1:10000; Santa Cruz Biotechnology, sc-2004).

Antibody binding was visualized with the enhanced chemiluminescence system (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific, Illkirch, France). For quantification, luminescence was detected with a Charge Couple Device (CCD) camera and analyzed using the GeneTools program (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

Immunoprecipitation

HEK293FT cells were transfected with different vectors: pPGS-3HA-TEAD1, pCMV-Flag-YAP-S94A and pCMV-Flag-S127A-YAP were gifts from Kunliang Guan (Addgene plasmids #33055, #33102 and #27370; RRID: Addgene-33055, -33102 and -27370). Smad3-Myc expression vector has been previously described (56).

Twenty-four hours after transfection, media were changed with fresh DMEM containing 1% FCS for 24 hours and TGF- β 1 (5 ng/ml) was added for 45 min. Transfected cells were then rinsed with ice-cold PBS and lysed in IP-lysis buffer (Invitrogen, Courtaboeuf, France). Protein concentrations were determined using Pierce™ BCA Protein Assay Kit. Equal amounts of proteins were precleared overnight at 4 °C using Protein-A/G-agarose (Santa Cruz biotechnology, CA). Supernatants were incubated with primary antibody against Flag (4 μ g/mL; Sigma Aldrich, F7425) and HA-tag (1:50; cell signalling, 3724S),

for 2 hours at 4°C. 50 µL of Protein-A/G-agarose were then added and incubated overnight at 4°C. Beads were washed three times with IP-lysis buffer, then 30 µL of Laemmli buffer were added and boiled for 5 min. After centrifugation, supernatants were harvested and processed for SDS-PAGE and Western Blot as described above.

In situ proximity ligation assay (PLA), immunofluorescence and confocal microscopy

Duolink PLA ®: 5x10³ OS cells were seeded in Ibidi µ-Slide VI 0.4. Twenty-four hours after, media was change to DMEM with 1% FBS. After 24 hours, TGF-β1 (5 ng/ml) was added or not for 45 min. Cells were then fixed with 4% PFA for 15 min at room temperature and incubated overnight at 4°C with primary antibody against YAP [(1:100; cell signalling, 14074) or (1:50; Santa Cruz biotechnology, sc-101199)], TEF-1(1:200; Santa cruz biotechnology, sc-376113) and SMAD3 (1:1000, abcam, ab40854). In situ PLA was performed using DuoLink in Situ Reagents (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence assays: cells were seeded onto Ibidi µ-Slide 8 Well overnight, fixed with 4% paraformaldehyde during 15 minutes, permeabilized with 0.5% Triton. Samples were incubated with Anti-Vinculin-FITC antibody (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) 2h at room temperature (1:200), and then washed in PBS. F-actin and nucleus were stained using respectively: Alexa-fluor 488 phalloidin (1:1000) and DAPI (1:1000). Images were acquired using a confocal microscope (NIKON A1 N-SIM), and processed using ImageJ.

RNA-seq and analysis

Library preparation and sequencing were done at Active Motif, inc. Libraries were prepared from purified RNA using the illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit and sequencing was done on illumina NextSeq 500 as 42-nt long paired end reads. Read mapping and fragment quantification for each gene was also done at Active Motif. Briefly read mapping against human genome (GRCh38) was done using STAR algorithm (57) with default settings and fragment assignment was done using feature counts (58) with gene annotations from Subread package. Only read pairs having both ends aligned with a minimum overlap of 25 base pairs and mapping to the same chromosome and on the same strand

were counted (featureCounts -p -B -C -minOverlap 25). Differential gene expression analysis was done using DESeq2 package (59). The p-values obtained were corrected for false positives by using Independent Hypothesis Weighting (package IHW) multiple testing adjustment method (60). Genes were considered significantly differentially expressed if log2 fold-change is over 1 or less than -1 and FDR is less than 0.05. For the differentially expressed genes over-representation and gene set enrichment analysis was done using clusterProfiler package and results were plotted using enrichPlot (61).

Further Gene Set enrichment analysis (GSEA) was performed using GSEA software (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>). Gene sets used are described in table 2.

Cell cycle analysis

Cells were seeded in 6-well plates overnight and synchronized using thymidine (Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) during 24h at a final concentration of 2 mM. Cells were released from thymidine block by PBS wash, maintained in normal culture media and harvested 10 hours after. Cells were then fixed with 70% ethanol and permeabilized 1 hour at 4°C. DNA was stained using 50 µg/ml propidium iodide 20 min at 4°C. cell cycle was analysed by flow cytometry (LSRII) using flowlogic software.

Statistics

Histogram and data are shown as mean +/- S.D. of minimum three independent experiments.

Statistical analyses were performed using GraphPad prism version 6 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. The Wilcoxon's matched test was used to compare the expression levels between OS and matched normal tissue. The Mann-Whitney test was used to compare the difference between two groups. p-value under or equal to 0.05 was considered statistically significant.

Database:

RNA sequencing data of OS patient and matched normal tissue were downloaded from Gene expression Omnibus database (GSE99671, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE99671>).

Kaplan Meier analysis of osteosarcoma patient tumor samples were performed using the R2 Genomics Analysis and Visualization Platform. Genome-wide gene expression analysis of high-grade osteosarcoma are from GSE42352 (62) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE42352>).

The datasets supporting the current study have not been deposited in a public repository because the article is not yet published, but are available from the corresponding author on request.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, S.M. and F.V.; Methodology, S.M., G.D., M.M., R.T., Formal Analysis, S.M., R.T., Investigation, S.M., G.D., M.M., J.A., R.B., S.R. and M.D., Resources, A.B.G., Writing-Original Draft, S.M., I.C. and V.F., Writing-Review & Editing, B.O., B.B.L.R. and F.R, Supervision, F.V, Funding Acquisition, S.M. and F.V.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Imagine for Margo, Société Française de lutte contre les cancers et les leucémies de l'enfant et de l'adolescent (SFCE), l'étoile de Martin, Enfants Cancers Santé, Ligue contre le cancer (comité 44 et 49). We thank Mrs Patricia Blanc (president of Imagine for Margo association) for her generous support. We thank members of Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes University (MicroPICell).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ostéosarcome est un cancer pédiatrique rare, prenant naissance le plus fréquemment au niveau de la métaphyse des os longs. Au diagnostic il n'est pas rare d'observer des métastases principalement pulmonaires. Malgré l'amélioration des traitements il y a une quarantaine d'année grâce à la mise en place de protocoles de chimiothérapie, la survie à 5 ans des patients atteints d'ostéosarcome reste faible. La dissémination métastatique est un problème majeur dans l'ostéosarcome, les mécanismes moléculaires sont encore mal compris et méritent d'être expliqués^{27,283,308-310}.

Depuis sa découverte dans la drosophile, la voie de signalisation Hippo a été au cœur d'une succession de découvertes, les chercheurs ont mis en évidence sa mécanistique et son implication dans le développement humain et dans diverses pathologies, notamment en cancérologie^{44,49,53,160}. Le niveau d'expression de YAP et son activité transcriptionnelle ont été étudiés dans plusieurs types de tumeurs solides et sont corrélés à un mauvais pronostic. Toutefois l'activation de YAP n'est pas expliquée par des mutations au cœur de la voie de signalisation. Dans un contexte tumoral, YAP a un rôle pro-oncogénique, les cellules cancéreuses détournent le rôle initial de YAP et ses effecteurs pour proliférer et potentiellement migrer. L'altération des tissus au sein d'une tumeur et la modification de la rigidité de la MEC peut avoir une conséquence sur l'activité de YAP et la prolifération excessive des cellules tumorales^{162,163,203,248}.

Dans ce travail de thèse, nous avons dans un premier temps associé une forte expression de YAP au mauvais pronostic des patients atteint d'ostéosarcome, en accord avec l'étude publiée en 2016 par Bouvier et al²⁷⁸. De plus, l'analyse bio-informatique de séquençage d'ARN haut débit provenant de biopsies de patient montre l'existence d'une signature génique de la voie de signalisation Hippo dans l'ostéosarcome. Nos résultats sont donc cohérents vis-à-vis des résultats déjà existants, dans l'ostéosarcome mais aussi dans d'autres tumeurs solides. Ces expériences demandent cependant à être confirmées sur une cohorte de patients plus importante en association avec les données cliniques.

I. YAP interagit avec TEAD pour induire la croissance tumorale

Les mécanismes moléculaires par lesquels YAP initie la prolifération cellulaire et la progression tumorale dans l'ostéosarcome restent à élucider.

Dans la première partie de nos résultats nous montrons le rôle majeur de YAP et du facteur de transcription TEAD dans la prolifération tumorale de l'ostéosarcome. Lorsque YAP n'est pas capable d'interagir avec le facteur de transcription TEAD, la prolifération cellulaire et la croissance de la tumeur sont ralenties *in vitro* et *in vivo*. Ces résultats confirment ceux déjà observés dans la littérature^{57,311}. TEAD est le partenaire le plus commun de YAP et de nombreuses études l'associent au contrôle de la croissance tissulaire et tumorale^{57,68,169}. L'analyse transcriptomique des cellules d'ostéosarcome surexprimant YAP pouvant ou non interagir avec TEAD montre la nécessité de ce facteur de transcription pour initier la transcription de gènes clés dans la prolifération. Dans plusieurs tumeurs, il a été montré que YAP stimule la prolifération cellulaire via TEAD en contrôlant l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire et différents oncogènes^{246,247}. Dans un contexte tumoral, la surexpression de ce facteur de transcription est corrélée à l'expression de facteur de croissance tel que CTGF et CYR61, et à des facteurs oncogènes tel que c-Myc et la survivine^{53,246,247}. Dans les cancers de la prostate, cancer gastrique et cancer colorectal, une augmentation du niveau protéique de TEAD est associée à un mauvais pronostic³¹²⁻³¹⁵. Liu-Chittenden et al ont montré que la surexpression d'un TEAD ne pouvant interagir avec YAP ralentissait la prolifération cellulaire *in vitro* et tumorale *in vivo*²⁴⁵. En accord avec ces différentes études, nous avons montré le rôle indispensable de TEAD dans la médiation de la prolifération cellulaire via YAP dans l'ostéosarcome. De manière intéressante, TEAD est fortement exprimé chez les patients atteints d'ostéosarcome et est corrélé à un mauvais pronostic.

Nous n'avons pas exploré tous les mécanismes par lesquels TEAD initie la prolifération, même si nos données actuelles semblent indiquer que les protéines CYR61 et CTGF, les cibles directes de YAP/TEAD, sont fortement impliquées dans la prolifération cellulaire. De plus, nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes favorisant la prolifération Gli1 et AKT1 dans les cellules d'ostéosarcome YAPS127A, surexprimant une forme mutée de YAP constitutivement active, et une diminution de l'expression de ces gènes dans les cellules YAPS94A, surexprimant une forme mutée de YAP ne pouvant interagir avec TEAD. Enfin, les

cellules d'ostéosarcome YAPS127A ont un cycle cellulaire plus rapide que les cellules YAPS94A et les MOCK. L'interaction YAP/TEAD semble donc avoir un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire et pourrait être un mécanisme expliquant l'augmentation de la prolifération cellulaire et de la croissance tumorale. Il serait intéressant de décrire le rôle exact de TEAD dans la médiation de la transcription des gènes pro-prolifératifs mais aussi de sa capacité à stimuler le cycle cellulaire dans l'ostéosarcome.

Un article publié très récemment montre que YAP maintient et stabilise les cellules tumorales mutées sur KRAS en coopérant avec Myc dans le cancer du pancréas. Dans ce cas spécifique, l'activation de YAP est une conséquence de la mutation KRAS mais est indispensable au maintien de la tumeur primaire^{221,316}. Une boucle de rétrocontrôle positive se met en place, l'activation de la voie RAF/MEK/ERK initie l'activité transcriptionnelle de YAP et entraîne la transcription des gènes cibles CYR61 et CTGF (Figure 18). Une seconde étude montre la capacité de TEAD2 à contourner l'inhibition de KRAS dans le cancer du pancréas. Le complexe YAP1/TEAD2 coopère avec le facteur de transcription E2F pour activer la division cellulaire et la réplication de l'ADN²²⁰.

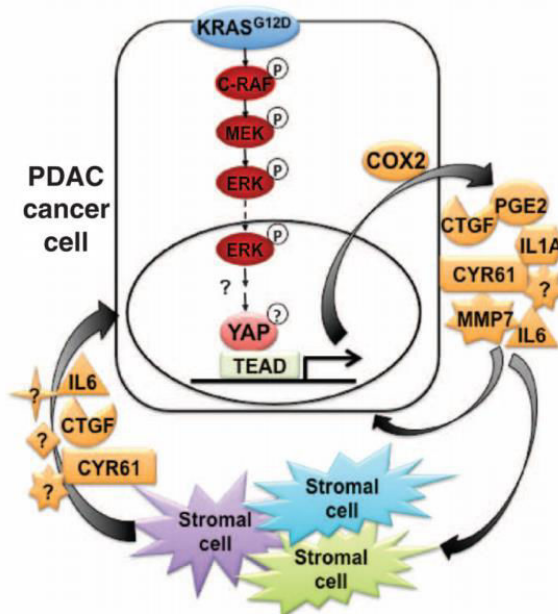


Figure 18 : Schéma représentant le rôle majeur de YAP dans le contrôle de la prolifération cellulaire médiée par KRAS

D'après Weiyang Zhang et. al²²¹

Au vu de ces données publiées dans la littérature et afin de mieux comprendre le rôle de TEAD dans l'initiation de la prolifération cellulaire, il serait intéressant d'étudier en profondeur les interactions entre la voie Hippo et la voie EGFR-RAS-RAF-MAPK dans l'ostéosarcome. De manière très intéressante, nous avons identifié une signature génique de KRAS et MEK dans les cellules d'ostéosarcome YAPS127A (Figure 19A). Parmi les gènes les plus différenciellement exprimés, on distingue notamment ADRB2, qui a un rôle anti-apoptotique et qui est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer de la prostate (Figure 19B).³¹⁷ ADRB2 est une cible indirecte de KRAS et accélère la progression tumorale dans le cancer du pancréas.^{318,319} Ces résultats préliminaires semblent s'accorder avec les données déjà publiées dans la littérature et il serait très intéressant d'étudier le rôle exact d'ADRB2 dans la prolifération cellulaire de l'ostéosarcome, notamment à l'aide de siRNA dirigés spécifiquement contre cette protéine. On retrouve toutefois une signature génique KRAS dans le modèle cellulaire YAPS94A. Cependant les gènes différenciellement exprimés par rapport aux cellules naïves ne sont pas les mêmes que dans le modèle cellulaire YAPS127A. Nos résultats *in vitro* et *in vivo* indiquent le rôle essentiel de TEAD dans la prolifération cellulaire de l'ostéosarcome, et étant donné le rôle de KRAS dans les phénomènes de résistance aux chimiothérapies et de migration cellulaire, on peut postuler que la signature génique retrouvée dans le modèle YAPS94A correspond aux gènes impliqués dans ces derniers processus biologiques. On retrouve notamment des collagènes et d'autres composants de la MEC.

Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que le complexe YAP/TEAD conduit les programmes de division cellulaire et réplication de l'ADN dans l'ostéosarcome en coopération avec la voie de signalisation EGFR-RAS-RAF-MAPK et ses facteurs de transcriptions.

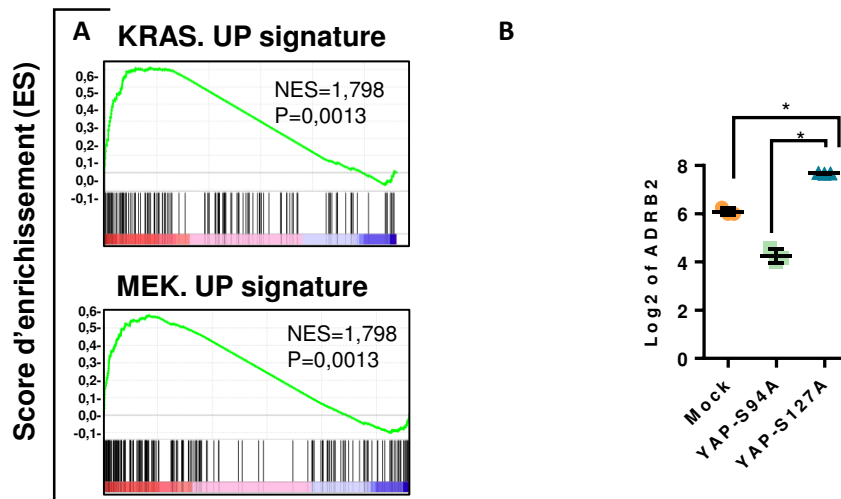


Figure 19 : La surexpression de YAP constitutivement actif dans l'ostéosarcome s'accompagne d'une signature génique KRAS.

A. Graphique représentant le score d'enrichissement de l'analyse GSEA montrant une surexpression significative de gènes associés à l'expression aberrante de KRAS dans les cellules d'ostéosarcome KHOS transduites avec YAPS127A en comparaison aux cellules KHOS-Mock. **B.** Expression médiane exprimée en $\text{Log}_2(\text{FPKM})$ d'ADRB2 extrait du RNA-sequencing à partir des cellules d'ostéosarcome KHOS transduites avec -YAPS127A, -YAPS941 et Mock.

Enfin, nous avons étudié l'inhibition de l'interaction YAP/TEAD à l'aide de la vertéporfine, une petite molécule utilisée initialement dans le traitement de pathologies ophtalmologiques. Comme décrit précédemment, des chercheurs ont mis en évidence son efficacité à inhiber l'interaction YAP/TEAD. La vertéporfine a été étudiée dans de nombreux cancers dans lesquels YAP est surexprimé et inhibe la croissance tumorale^{248,250,252,320}. Nos résultats sont similaires aux différentes études publiées à ce jour, la vertéporfine inhibe la progression tumorale dans l'ostéosarcome *in vitro* comme *in vivo*. Notre travail montre que la vertéporfine inhibe les gènes cibles de la voie de signalisation Hippo, cependant différentes études mettent en avant le manque de spécificité de cette molécule. En effet, les effets que nous observons *in vitro* comme *in vivo* pourraient ne pas être spécifiques de l'inhibition du complexe YAP/TEAD. De plus, il semble que la vertéporfine inhibe l'activité transcriptionnelle de YAP en empêchant sa rétention cytoplasmique, et non pas en empêchant YAP d'interagir avec son facteur de transcription²⁵³. Il serait intéressant d'utiliser un shRNA dirigé spécifiquement contre TEAD afin de valider les hypothèses décrites précédemment.

Pour être efficace *in vivo*, la vertéporfine doit être utilisée à des doses élevées mais, comme de nombreuses molécules innovantes utilisées en cancérologie, c'est une drogue

ayant des caractéristiques hydrophobes et difficile à solubiliser dans une solution d'injection classique. Il est donc important de noter que la dose administrée au animaux peut être faussée compte tenu d'une mauvaise solubilisation de la molécule. Des produits tels que la cyclodextrines pourraient améliorer sa solubilisation pour palier à ce problème. Afin de palier à cet enjeu majeur, de nombreuses compagnies pharmaceutiques s'intéressent à la voie de signalisation Hippo et au développement de molécules innovantes pouvant inhiber spécifiquement l'interaction entre YAP et TEAD.

II. YAP stimule la dissémination métastatique indépendamment de TEAD

Après avoir découvert le rôle pro oncogène de la voie de signalisation Hippo dans différentes tumeurs solides, les chercheurs se sont plus spécifiquement intéressés aux processus biologiques clés du développement tumoral, notamment l'implication des effecteurs YAP et TAZ dans la dissémination métastatique. Différentes publications ont montré l'implication de YAP dans la dissémination métastatique de carcinomes^{126,298}. Cependant les mécanismes moléculaires ne sont pas totalement élucidés et les études publiées montrent principalement le rôle du complexe YAP/TEAD dans la dissémination métastatique^{203,321,322}.

Dans l'ostéosarcome, nous avons montré que la surexpression de YAP augmente la dissémination métastatique *in vivo*, indépendamment de la capacité de YAP à interagir avec son facteur de transcription TEAD. De plus, l'analyse transcriptomique de biopsies de patients indique qu'un niveau d'expression de YAP élevé corrèle avec la présence de métastases au diagnostic.

A. YAP initie le processus d'EMT dans l'ostéosarcome

De manière intéressante, nos modèles cellulaires de transduction stable de YAP sont associés à une modification morphologique des cellules. En effet, elles adoptent une morphologie plus allongée, associée à un profil mésenchymateux favorable à la migration cellulaire. A l'aide de ces mêmes modèles cellulaires nous avons montré que YAP, indépendamment de sa capacité à interagir avec TEAD, stimule l'expression de gènes mésenchymateux tels que la N-Cadhérine ou la vimentine, ainsi que l'expression de facteurs de transcription clés dans le processus de l'EMT comme Snail et Twist2. Ces résultats sont en accord avec d'autres données publiées dans la littérature utilisant une stratégie moléculaire inverse³²³. En effet, l'utilisation de siRNA dirigés contre YAP dans un modèle de cancer du poumon à petites cellules provoque un changement de morphologie des cellules tumorales vers des cellules rondes, moins allongées perdant leur capacité à migrer.³²³ Enfin, dans l'adénocarcinome du pancréas l'extinction de YAP est associée à la perte d'expression des marqueurs mésenchymateux et à un défaut de migration cellulaire *in vitro*^{324,325}.

Il serait pertinent d'étudier les conséquences de l'extinction de YAP dans le processus d'EMT-like de l'ostéosarcome, à l'aide d'outils moléculaires tels que des siRNA ou des shRNA, ou bien grâce à des outils pharmacologiques avec la vertéporfine. Cela confirmerait les résultats obtenus par nos modèles cellulaires de surexpression.

Nos résultats montrent que TEAD n'est pas indispensable à YAP pour initier le processus d'EMT-like dans l'ostéosarcome. Cependant, YAP ne peut pas initier la transcription de gènes clés de l'EMT sans partenaire. Il est aujourd'hui admis que les voies de signalisation n'exercent pas leurs activités transcriptionnelle isolées les unes des autres mais fonctionnent en réseaux complexes. On peut alors penser que d'autres acteurs connus pour leur rôle dans l'EMT tel que le TGF- β /Smads ou la β -caténine, coopèrent avec la voie Hippo^{88,89,160}. Il serait intéressant d'étudier le rôle de chaque partenaire de YAP identifiés dans l'ostéosarcome.

1) YAP et la voie du TGF- β

Il est maintenant largement admis que le TGF- β agit à la fois comme suppresseur de tumeur dans les carcinomes en phase précoce et comme promoteur de tumeur dans les carcinomes en phase tardif^{95,96,211}. Concernant l'ostéosarcome, il a été démontré au laboratoire que le TGF- β exerce une activité pro-tumorale en stimulant la capacité des cellules d'ostéosarcome à migrer et à envahir, et donc en stimulant le développement de métastases pulmonaires^{190,190,195,196}. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que YAP initie le processus métastatique de l'ostéosarcome via la voie de signalisation TGF- β / Smad3.

Etant données le rôle majeur du TGF- β dans l'EMT et des données déjà publiées sur l'existence d'un crosstalk entre la voie de signalisation Hippo et la voie du TGF- β , nous nous sommes intéressés aux possibles interaction entre ces deux voies de signalisation dans l'EMT.

Nos résultats confirment l'existence d'un complexe YAP/Smad3 dans l'ostéosarcome qui a déjà été identifié dans d'autres types cellulaires³⁰². De plus, nous avons montré que la présence de TEAD n'est pas indispensable à la formation du complexe YAP/Smad3. Dans nos modèles cellulaires, la surexpression stable de YAP s'accompagne d'un enrichissement génique spécifique au TGF- β . Enfin, l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur au TGF- β TBRI, le SD-208, inhibe la dissémination métastatique médiée par YAP dans l'ostéosarcome *in vivo*. Ces résultats confirment l'existence d'un réseau entre la voie de signalisation Hippo et la voie du TGF- β /Smads initiant la dissémination métastatique de l'ostéosarcome.

Pour mieux expliquer les mécanismes moléculaires à l'origine de ces processus nous avons étudié les gènes différentiellement exprimés dans nos différents modèles cellulaires. YAP conduit à une augmentation de l'expression de gènes indispensables à l'EMT tels que Snail, Slug ou bien Twist en réponse au TGF- β , et ceci indépendamment de sa capacité à interagir avec TEAD. On peut donc penser que TEAD n'est pas indispensable au processus de dissémination métastatique dans l'ostéosarcome. Cependant, nous n'observons pas le même profil d'expression génique entre les cellules YAP-S94A et les cellules YAP-S127A. En effet, les deux types de mutation entraînent un enrichissement de gènes liés à la migration cellulaire, mais ces gènes sont en partie différents. Même si on ne peut pas exclure le rôle de TEAD dans le processus de migration cellulaire, la protéine n'est toutefois pas indispensable. Smad3 pourrait compenser l'absence d'interaction avec TEAD pour mettre en place les processus de migration cellulaire. De façon très intéressante, nous observons chez nos 2 modèles surexprimant YAP une expression et une activité plus importante des MMPs en réponse au TGF- β que les cellules KHOS contrôle, effet accentué chez le modèle YAP-S94A lorsque YAP n'interagit pas avec TEAD. On retrouve les mêmes résultats au niveau de l'expression des gènes impliqués dans l'EMT. Lorsque YAP ne peut pas interagir avec TEAD, la protéine est sûrement totalement disponible pour interagir avec Smad3. Cela doit également dépendre du microenvironnement spécifique de l'ostéosarcome. En effet le TGF- β présent dans le microenvironnement tumoral de l'ostéosarcome s'accompagne de la nucléarisation de Smad3 dans les cellules tumorales¹⁹⁰. Smad3 est donc disponible pour former un complexe avec YAP et induire l'EMT.

2) YAP et la voie Wnt/b-caténine

Notre étude a permis d'identifier le rôle majeur de YAP dans l'induction de l'EMT via Smad3. Néanmoins la voie de signalisation Hippo fait partie d'un réseau complexe composé d'une multitude de voies de signalisation, comme la voie Wnt/b-caténine. Il est admis que la voie de signalisation Wnt/b-caténine coopère avec la voie Hippo dans le contexte de la fibrose, c'est également un acteur connu dans le processus de migration cellulaire de différents carcinomes ^{83,88,160,326,327}.

L'analyse du transcriptome des cellules mutantes surexprimant YAP a permis l'identification d'une signature Wnt, indépendamment de la capacité de YAP à interagir avec TEAD. Ces résultats, ajoutés aux expériences de PLA et de luciférase, indiquent l'existence d'interactions

fonctionnelles entre YAP et la β -caténine, permettant l'activation de gènes impliqués dans différentes fonctions biologiques. Les gènes BAMBI et SULF2 font partis des gènes cibles de Wnt les plus différentiellement exprimés dans nos modèles cellulaires (Figure 20), et sont impliqués dans le processus d'EMT³²⁸⁻³³¹. Nos résultats semblent indiquer que ces gènes sont également une cible de YAP. Le rôle de ces protéines dans l'ostéosarcome reste cependant à élucider.

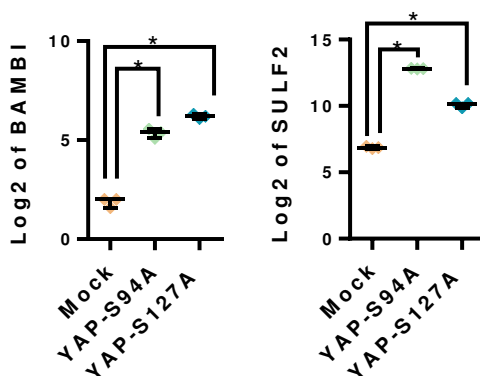


Figure 20 : YAP entraîne l'expression de gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine

Expression médiane exprimée en Log₂(FPKM) de BAMBI et SULF2 extrait du RNA-seq à partir des cellules d'ostéosarcome KHOS transduites avec -YAPS127A, -YAPS941 et Mock.

Il serait pertinent d'étudier le rôle exact que joue YAP dans la signalisation médiée par Wnt/ β caténine, notamment dans le processus de migration cellulaire. Il existe de nombreux inhibiteurs de cette voie de signalisation, certains utilisés en essai clinique. L'utilisation d'un inhibiteur du récepteur Frizzled dans les cellules d'ostéosarcome surexprimant YAP pourrait nous donner plus d'informations sur la fonction de Wnt/ β cat. En effet, en inhibant la voie de signalisation Wnt dans ces cellules, de la même manière que nous avons utilisé le SD-208 pour inhiber le TGF- β , la migration des cellules médiée par YAP pourrait être ralentie. Des expériences *in vitro* et *in vivo* pourront confirmer ces hypothèses, notamment grâce à des tests de migration en temps réel. Pour aller plus loin, une analyse du transcriptome haut débit en RNA-seq, après l'inhibition de la voie Wnt, nous aiderait à déterminer les cibles transcriptionnelles spécifiques de l'interaction entre YAP/ β caténine. *In vivo*, l'utilisation d'un

inhibiteur pharmacologique nous donnerait des informations essentielles quant au rôle de la voie Wnt/ β cat dans la dissémination métastatique de l'ostéosarcome. Toutefois, cette voie de signalisation est également connue pour son rôle dans la prolifération des cellules tumorales. Si l'inhibition de Wnt résulte en l'inhibition de la croissance tumorale comme de la dissémination métastatique, il sera difficile d'établir son rôle précis dans la migration cellulaire⁸³.

YAP serait un acteur central jouant un rôle important dans la signalisation médiée par le TGF- β et Wnt. La voie de signalisation Hippo pourrait soutenir chacune de ces voies de signalisation dans les processus biologiques auxquelles elles sont associées.

B. YAP induit un changement phénotypique pro-migratoire dans l'ostéosarcome

La réorganisation de l'architecture du cytosquelette d'actine et des complexes de polarité est essentielle à l'EMT et à la migration cellulaire. Les cellules tumorales changent de forme, s'allongent et leur polarité est modifiée. Les cellules qui subissent l'EMT réorganisent leur cytosquelette d'actine permettant ainsi l'élongation et la mobilité des cellules. Les membranes cellulaires s'enrichissent en actine pour créer des projections et faciliter le mouvement de la cellule. Ces processus sont associés à l'augmentation de la contractilité de la cellule et à la formation de fibres de stress³³². Plusieurs protéines régulatrices du remodelage du cytosquelette ont été identifiées, notamment la myosine, mais les mécanismes d'actions de ces régulateurs pendant l'EMT restent à élucider. Plusieurs études ont associé l'activité de YAP à la stabilité du cytosquelette d'actine, majoritairement via le contrôle des RHO GTPase^{123,333-335}.

La surexpression de YAP, indépendamment de sa capacité à interagir avec TEAD, entraîne un changement morphologique des cellules tumorales d'ostéosarcome *in vitro*, elles ont un profil plus allongé, associé à un remodelage du cytosquelette. L'analyse transcriptomique révèle un enrichissement des gènes liés aux points focaux d'adhésion. Les mécanismes par lesquels YAP contrôle le remodelage du cytosquelette d'actine ne sont pas encore totalement élucidés et nous avons identifié pour la première fois le rôle majeur de YAP dans ce processus. En effet, les études déjà publiées montrent le rôle pro migratoire de YAP et l'influence du cytosquelette

d'actine sur la localisation nucléaire de YAP, mais la réciproque n'avait pas été démontrée^{125,298,334,336}.

Dans nos modèles, la surexpression de YAP dans l'ostéosarcome peut augmenter la dissémination métastatique par plusieurs mécanismes, d'abord en initiant l'EMT en coopérant avec d'autres voies de signalisation comme expliqué précédemment, mais aussi en modifiant le cytosquelette pour aider les cellules à obtenir un phénotype pro-migratoire. On peut se demander si le remodelage du cytosquelette d'actine est une conséquence de la mise en place de l'EMT ou bien de l'activité transcriptionnelle directe de YAP. Dans notre système de surexpression stable, on ne peut pas déterminer les mécanismes exacts d'action de YAP. Il serait très intéressant d'utiliser des outils moléculaires stables tels que des shRNA inductibles, ou bien transitoires comme des siRNA, dirigés contre YAP. En effet, il sera alors possible de suivre la cinétique d'action de YAP dans les processus d'EMT et de migration cellulaire.

On peut imaginer un système dans lequel YAP à l'aide de différents facteurs de transcription initie l'EMT et l'expression de différents gènes indispensables à ce processus. La cellule tumorale doit maintenir ce phénotype pro-migratoire, pour cela les changements morphologiques de la cellule associés à la formation de fibres de stress initiés par l'EMT pourraient renforcer la localisation nucléaire de YAP qui, via l'expression de différents gènes, maintiendrait le cytosquelette d'actine organisé et favoriserait la formation des complexes de points focaux d'adhésion. Ces processus pourraient induire une boucle de rétrocontrôle positive sur la migration des cellules tumorales.

C. YAP induit le remodelage de la MEC

Les composants du stroma tumoral, qui constituent le microenvironnement tumoral, sont composés de la MEC, des vaisseaux sanguins et lymphatiques et des cellules stromales comprenant les cellules endothéliales, les cellules immunitaires et les fibroblastes associés aux carcinomes (FACs)^{337,338}. Les fibroblastes sont activés par des facteurs solubles tels que le TGF- β et produisent des protéines de la MEC. Le microenvironnement tumoral rigide est favorable à la prolifération cellulaire et à la migration des cellules tumorales mais permet également la prolifération des FACs. Comme décrit auparavant, l'activité de YAP est régulée par la rigidité de la MEC, favorisant la survie des cellules tumorales¹²⁶. Dans le contexte du microenvironnement de l'ostéosarcome, la MEC joue un rôle majeur notamment en

permettant le stockage de nombreuses protéines et cytokines pro-migratoires tels que les MMPs et le TGF- β ¹⁹⁰.

De manière très intéressante, nous avons observé la formation excessive de matrice extracellulaire riche en collagène dans les tumeurs formées à partir des modèles cellulaires surexprimant YAP. De plus, l'analyse transcriptomique de nos modèles cellulaires a permis d'identifier le rôle de YAP dans la production de gènes participant à la formation de la MEC tels que les collagènes ou les laminines, indépendamment de son interaction avec TEAD. Nos résultats semblent être en accord avec une étude menée en 2014 par Chang et al. Dans le cancer du sein, l'homologue de YAP, TAZ, induit l'expression de gènes composant de la MEC³³⁹. Le rôle du TGF- β et de la β -caténine dans la formation de MEC étant largement décrit, spécifiquement dans la fibrose¹⁶⁰, nous avons étudié dans notre contexte les interactions potentielles entre la voie de signalisation Hippo et les voies du TGF- β /Smad3 et Wnt/ β -caténine. Comme décrit précédemment, nous avons identifié un complexe fonctionnel YAP/Smad3 dans l'ostéosarcome, associé à l'expression d'une signature génique spécifique du TGF- β . De façon intéressante, on retrouve parmi cette signature génique des gènes indispensables à la formation de la MEC qui sont également des cibles du TGF- β . Nous avons également décrit un complexe YAP/ β -caténine fonctionnel dans les cellules d'ostéosarcome *in vitro*. Il est admis que la voie Wnt/ β -caténine induit le remodelage de la MEC en augmentant l'expression des composants de la matrice. Etudier les rôles précis des complexes YAP/Smad3 et YAP/ β -caténine dans la formation de MEC et le maintien d'un microenvironnement tumoral propice à la migration et la dissémination métastatique pourrait nous apporter de nouvelles informations essentielles à la compréhension du développement de l'ostéosarcome.

Enfin, il a été également démontré que la rigidification de la MEC entraîne la prolifération des FACs dans le microenvironnement tumoral résultant à la sécrétion de protéines de la matrice. Ce phénomène favorise d'autant plus le caractère rigide de la MEC, YAP se nucléarise alors dans les cellules tumorales qui produisent à leur tour des protéines de la matrice, établissant un cercle vicieux entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. Il serait intéressant d'étudier le rôle de YAP dans cet aspect de la progression tumorale de l'ostéosarcome, notamment en isolant les cellules du microenvironnement tumoral *in vivo* dans les tumeurs formées à partir de nos modèles cellulaires surexprimant YAP.

D. YAP semble stimuler l'angiogenèse dans l'ostéosarcome

L'angiogenèse tumorale est essentielle au maintien de la tumeur primaire et à la dissémination métastatique de l'ostéosarcome. La mise en place de vaisseaux sanguins autour de la tumeur permet aux cellules tumorales de passer dans la circulation sanguine et envahir des tissus secondaires^{171,340}. Etant donné le rôle de YAP dans l'angiogenèse^{174,176,311} et la capacité des cellules tumorales surexprimant YAP à métastaser, il serait intéressant d'étudier l'implication exact de YAP dans l'angiogenèse tumorale.

De façon très intéressante, nous avons identifié une signature génique associée à l'angiogenèse dans nos modèles cellulaires surexprimant YAP, indépendamment de sa capacité à interagir avec TEAD (Figure 21A). Il sera nécessaire de confirmer ces résultats préliminaires. En analysant le milieu conditionné des cellules surexprimant YAP nous pourrions identifier des marqueurs pro-angiogéniques. De plus, des tests de tubulogenèse *in vitro* avec ce même milieu conditionné nous permettront de confirmer le rôle fonctionnel de YAP dans la formation de néovaisseaux. Enfin, il sera indispensable d'étudier les marqueurs de l'angiogenèse par immunohistochimie sur les tumeurs formées à partir de nos modèles cellulaires.

Nous avons identifié deux gènes différentiellement exprimés dans nos modèles cellulaires, CXCL1 et CXCL8, connus pour leurs propriétés pro-angiogéniques via la stimulation des cellules endothéliales en se liant à leurs récepteurs spécifiques³⁴¹⁻³⁴⁴(Figure 21B). Ces résultats sont particulièrement intéressants au vu des données présentes dans la littérature. En effet, une étude publiée par Deng et son équipe décrit le rôle de ces chimiokines dans l'angiogenèse tumorale du cancer du sein³⁴². Il serait intéressant de confirmer ces résultats au niveau protéique en analysant leur concentration dans les milieux conditionnés des cellules tumorales, puis d'associer des tests de tubulogenèse à un inhibiteur spécifique des récepteurs CXCRs.

Toutefois la signature pro-angiogénique que l'on retrouve dans nos modèles cellulaires n'est peut-être pas une conséquence directe des capacités transcriptionnelle de YAP mais une conséquence de l'activation d'autres voies pro-tumorales telles que la voie des

PI3K/AKT/mTOR ou KRAS/MAPK, connues pour leurs implications dans l'angiogenèse tumorale.

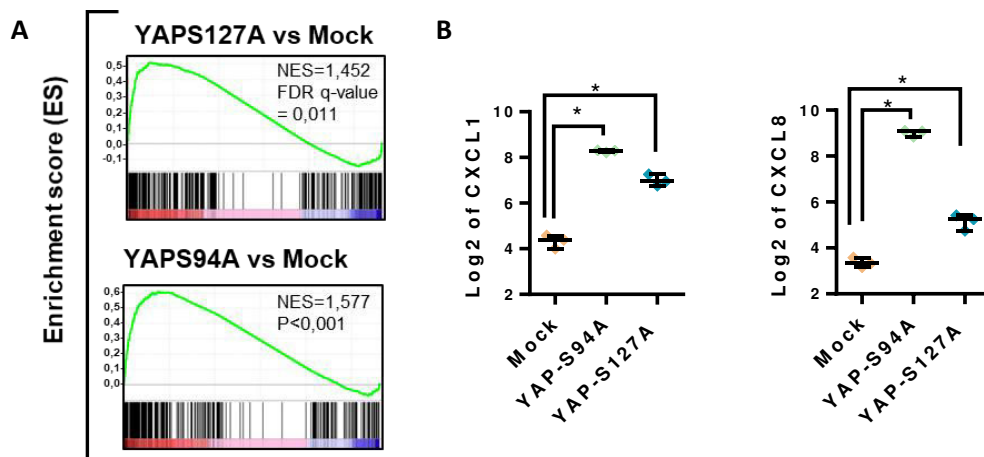


Figure 21 : La surexpression de YAP s'accompagne d'une signature génique pro-angiogénique

A. Graphique représentant le score d'enrichissement de l'analyse GSEA montrant une surexpression significative de gènes associés à l'angiogenèse dans les cellules d'ostéosarcome KHOS transduites avec YAPS127A et YAPS94A en comparaison aux cellules KHOS-Mock. **B.** Expression médiane exprimée en Log₂(FPKM) de CXCL1 et CXCL8 extrait du RNA-sequencing à partir des cellules d'ostéosarcome KHOS transduites avec -YAPS127A, -YAPS941 et Mock.

E. Conclusion

Notre étude s'est focalisée sur les interactions entre la voie de signalisation Hippo et la voie du TGF- β dans les processus pro-migratoires de l'ostéosarcome. Cependant, malgré la capacité des cellules tumorale à migrer et former des métastases en l'absence de TEAD, le complexe YAP/TEAD est tout de même un moteur non négligeable dans le développement tumoral de l'ostéosarcome. TEAD est d'abord indispensable à l'induction de la prolifération cellulaire médiée par YAP, et de nombreuses études ont décrit le rôle de ce facteur de transcription dans les processus de migration cellulaire, EMT, et dissémination métastatique en cancérologie.

Nos travaux ont permis d'identifier le rôle des autres partenaires de YAP dans des processus clés du développement de l'ostéosarcome, en plaçant YAP comme acteur central de la progression tumorale via ses différents facteurs de transcription. Cibler spécifiquement YAP dans l'ostéosarcome semble ouvrir des perspectives thérapeutiques intéressantes étant

donné les rôles multiples de ce cofacteur de transcription, notamment pour les patients métastatiques.

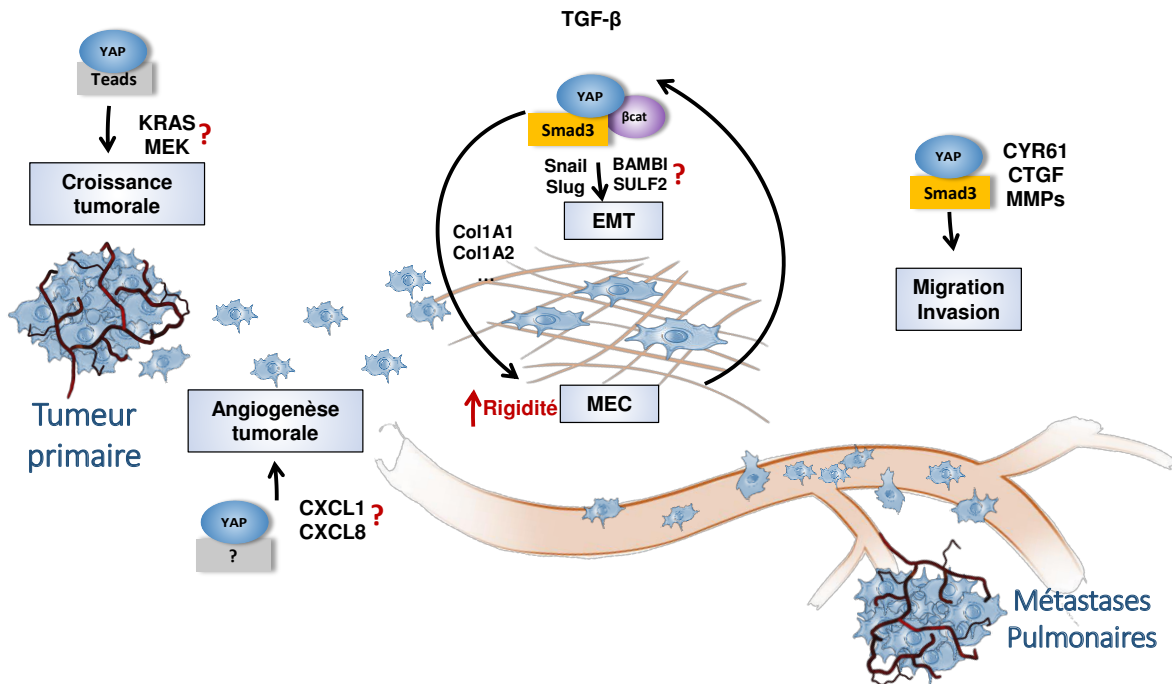


Figure 22 : Schéma récapitulatifs du rôle de YAP dans la croissance tumorale et la dissémination métastatique dans l'ostéosarcome.

III. Mécanismes de résistance dans l'ostéosarcome

La rechute et la résistance aux traitements de chimiothérapie sont deux des principales raisons de l'incapacité à éradiquer le cancer. L'utilisation des premières chimiothérapies combinées dans les années 1960 a marqué un changement dans le traitement du cancer, rendant cette pathologie curable. La combinaison de plusieurs chimiothérapies a montré sa supériorité face à l'utilisation d'une seule molécule via de multiples mécanismes. Elle permet de cibler plusieurs cibles thérapeutiques simultanément, réduit les effets secondaires, diminue le dosage de chaque molécule, mais prévient aussi de la résistance aux chimiothérapies. Malgré cela, la résistance acquise se développe irrémédiablement à l'exposition de certaines chimiothérapies^{216,218,345}. La réponse clinique aux agents de chimiothérapie dans le traitement des cancers métastatiques ou en rechute est très faible³⁴⁶. Cela suggère qu'une résistance acquise ou innée survient presque inévitablement chez ces patients. L'aptitude des cellules tumorales à muter et à esquiver les agents de chimiothérapies peut expliquer certains phénomènes de résistance. Les cellules tumorales peuvent développer des résistances aux drogues dus à des facteurs intrinsèques, tels que des mutations, translocations, événements épigénétiques, via des facteurs extrinsèques tels que l'hypoxie, le pH du milieu extracellulaire, les hormones, les agents antinéoplasiques, mais aussi aux diverses cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral. Enfin, l'hétérogénéité tumorale et la multiplication des mutations génétiques sont associées à l'apparition de résistances acquises²¹⁶⁻²¹⁸.

Les agents de chimiothérapies cytotoxiques les plus utilisés sont des composants chimiques tuant les cellules tumorales plus efficacement que les cellules saines. Cependant les connaissances en cancérologie se sont considérablement développées et ont mené à la découverte de molécules anticancers ciblant des voies de signalisation très spécifiques, qu'on nomme thérapie ciblée^{216,347}. Les mécanismes de résistances divergent entre les agents cytotoxiques et les thérapies ciblées. Les défauts de transporteurs ABC, les mécanismes de détoxification enzymatique, et les mécanismes de réparation à l'ADN sont majoritairement des mécanismes associés aux agents cytotoxiques, tandis que les thérapies ciblées sont souvent associées à des mécanismes de résistances moléculaires via différentes voies de signalisation²¹⁶.

Une des premières causes d'échec thérapeutique dans l'ostéosarcome est le développement de résistance aux agents anticanciers. La majorité des protocoles utilisent un cocktail de chimiothérapies très agressives constituées de cisplatine, doxorubicine et méthotrexate à haute dose^{7,308}. L'utilisation de thérapies ciblées dans l'ostéosarcome est difficile compte tenu des nombreuses aberrations génétiques retrouvées dans les tumeurs. Toutefois, plusieurs molécules sont utilisées en essai clinique dans le cadre d'échec thérapeutique aux agents conventionnels^{18,346,348}. Le développement de résistances multiples est l'obstacle majeur dans le traitement des ostéosarcomes.

Etant donné les études émergentes sur le rôle de YAP dans de multiples mécanismes de résistances aux chimiothérapies, cibler cette protéine dans l'ostéosarcome pourrait en plus d'inhiber les processus clés du développement tumorale, cibler les cellules résistantes aux agents de chimiothérapies dans le but de resensibiliser les cellules tumorales aux drogues cytotoxiques.

A. La voie Hippo dans la résistance de l'ostéosarcome aux chimiothérapies

Au sein du laboratoire, des lignées cellulaires d'ostéosarcomes résistantes à la cisplatine et à la doxorubicine ont été générées via l'administration de doses progressives d'agents de chimiothérapie. Les cellules tumorales résistent à des concentrations de drogues jusqu'à 200 fois supérieurs aux concentrations efficaces médianes (Figure 23). Des analyses transcriptomique haut débit ont été réalisées sur ces cellules.

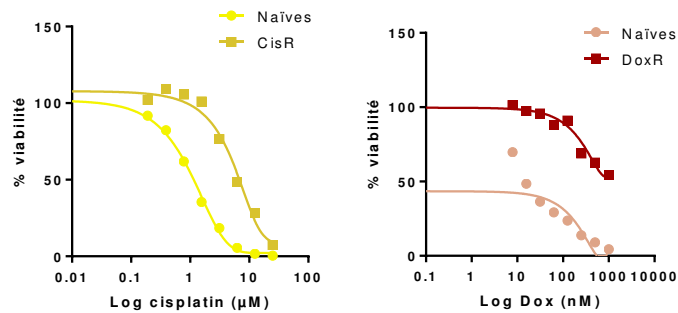


Figure 23 : Tests de viabilité sur lignées d'ostéosarcome résistantes à la cisplatine et à la doxorubicine

Les cellules d'ostéosarcome HOS naïves et des cellules HOS résistantes à la cisplatine et à la doxorubicine ont été traitées avec respectivement de la cisplatine et de la doxorubicine aux doses indiquées, un crystal violet a été réalisé après 72H

L'analyse bio-informatique des RNAseq réalisés sur les cellules résistantes à la cisplatine ont révélé un enrichissement de la signature génique Hippo comparé aux cellules contrôle. On observe notamment l'augmentation de l'expression des gènes cibles CTGF, CYR61, BIRC5 et PAI-1 dans les cellules résistantes à la cisplatine comparé aux cellules naïves (Figure 24). De façon très intéressante, les kinases inhibitrices MST1 et LATS sont, elles, inhibées dans les cellules résistantes à la cisplatine, ce qui pourrait être une explication de la surexpression des gènes cibles de la voie Hippo (Figure 25). La voie de signalisation Hippo semble inactive dans le modèle cellulaire résistant à la cisplatine.

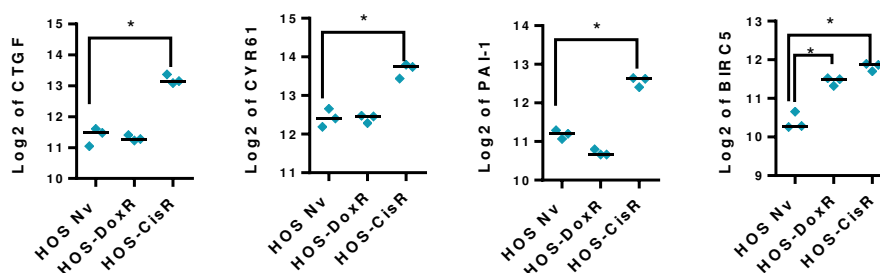


Figure 24 : Surexpression des gènes cibles de la voie Hippo dans les lignées résistantes aux chimiothérapies comparées aux cellules naïves.

Expression médiane exprimée en Log₂(FPKM) de CTGF, CYR61, PAI-1 et BIRC5 extrait du RNA-sequencing à partir des cellules d'ostéosarcome naïves, résistantes à la doxorubicine ou à la cisplatine.

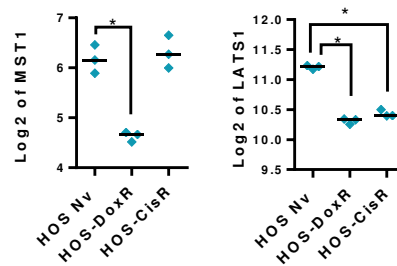


Figure 25 : Inhibition de l'expression des kinases inhibitrices de la voie Hippo dans les lignées résistantes aux chimiothérapies comparées aux cellules naïves.

Expression médiane exprimée en $\text{Log}_2(\text{FPKM})$ de *MST1* et *LATS1* extrait du RNA-sequencing à partir des cellules d'ostéosarcome naïves, résistantes à la doxorubicine ou à la cisplatine.

Plusieurs hypothèses pourraient expliquer les mécanismes moléculaires menant à la résistance des cellules d'ostéosarcome à ces molécules. Comme expliqué auparavant, YAP pourrait être un acteur central dans la résistance à la chimiothérapie, d'abord en induisant l'expression de gènes codant pour les transporteurs ABC, via le remodelage de la matrice extracellulaire mais aussi en activant les voies de signalisations de survie MAPK et PI3K afin de contourner les agents cytotoxiques.

1) YAP et les transporteurs ABC

Les résistances via la surexpression de transporteurs ABC sont les mieux décrites dans la littérature. Lorsque le spectre de résistance est très large, que les cellules tumorales ne sont pas plus résistantes à un agent cytotoxique qu'un autre, on appelle ce phénomène « multidrug resistance » (MDR)³⁴⁷. Les transporteurs ABC ont été les modèles de MDR les premiers décrits et les plus étudiés. Ils peuvent capter les agents cytotoxiques et les transporter directement dans le milieu extracellulaire³⁴⁹⁻³⁵². Ce mécanisme est la principale cause d'échec thérapeutiques aux agents cytotoxiques et des inhibiteurs des transporteurs ABC ont été testés. Ils montrent cependant une toxicité très importante. De façon particulièrement intéressante, nous observons une forte surexpression de deux gènes codant pour deux transporteurs ABC (Figure 26) largement décrit dans les mécanismes de résistances aux agents cytotoxiques. Certaines études démontrent l'implication de YAP en tant que régulateur positif

de l'expression de ces transporteurs en réponse à des agents cytotoxiques ciblant les microtubules ou le métabolisme³⁵³⁻³⁵⁵. Par ailleurs, une étude publiée en 2016 montre que l'utilisation d'un CRISPR-Cas9 dirigé contre ABCB1 dans l'ostéosarcome resensibilise des cellules tumorales résistantes à la doxorubicine *in vitro*³⁵¹. Bien que ce mécanisme n'ait pas été décrit dans le contexte de résistance induite par la cisplatine, nos résultats préliminaires semblent être en accord avec les résultats déjà publiés dans la littérature. Il faudra bien sûr confirmer ces résultats au niveau protéique et fonctionnel, notamment à l'aide d'inhibiteur de YAP et des inhibiteurs de transporteurs déjà utilisés en essais cliniques. Enfin il serait intéressant d'analyser l'activité des transporteurs ABC dans les lignées résistantes aux chimiothérapies

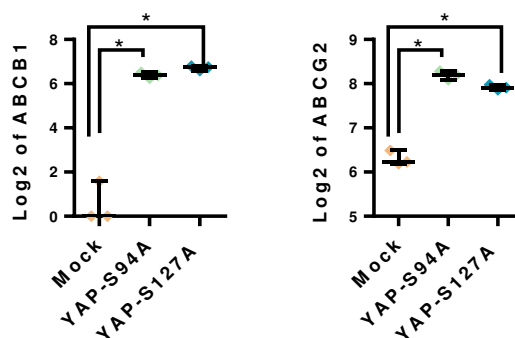


Figure 26 : YAP semble augmenter l'expression des transporteurs ABC

Expression médiane exprimée en Log2(FPKM) de ABCB1 et ABCG2 extrait du RNA-sequencing à partir des cellules d'ostéosarcome KHOS transduites avec -YAPS127A, -YAPS941 et Mock.

2) YAP et la voie des PI3K

Nos résultats précédents ont montré que la surexpression de YAP dans l'ostéosarcome était associée à la surexpression de Akt1 qui est un acteur majeur de la voie de survie PI3K. Des résultats préliminaires indiquent une surexpression de AKT1 dans les cellules résistantes à la doxorubicine, ainsi que AKT1 et mTOR dans les cellules résistantes à la cisplatine (Figure 27). Ces résultats préliminaires sont particulièrement intéressants et sont en accord avec une étude publiée récemment dans laquelle YAP permettrait d'induire la résistance à un inhibiteur de RAF en activant la voie de survie PI3K^{356,357}.

Il serait très intéressant de confirmer d'abord ces résultats au niveau protéique et fonctionnel, à l'aide de western blot, mais aussi d'analyser tous les acteurs de la voie de signalisation PI3K dans les différents modèles cellulaires de résistance. Utiliser un inhibiteur de YAP dans ces lignées d'ostéosarcome pourrait permettre de livrer de nouvelles informations quant au rôle de la voie Hippo dans la voie PI3K. De façon intéressante la voie PI3K/AKT/mTOR est l'une des plus dérégulées lors de la tumorigénèse mais aussi dans les mécanismes de résistance après traitement.

Nos résultats semblent s'accorder avec les données déjà publiées dans la littérature. L'activation aberrante de PI3K/mTOR est fréquente dans de nombreux cancers et représente une cible thérapeutique attractive³⁵⁸. Cependant, des phénomènes de résistance arrivent presque inévitablement à la suite de thérapies ciblant cette voie de signalisation. Ces résistances apparaissent également après l'utilisation d'agents cytotoxiques tels que la cisplatine ou la doxorubicine, les cellules mettent en place des mécanismes de compensation en activant des voies de signalisation de survie et de prolifération cellulaire^{216,347,359}. Il serait intéressant d'utiliser un inhibiteur de PI3K/AKT/mTOR en combinaison avec un inhibiteur de la voie Hippo pour déterminer le rôle précis de ces voies de signalisation dans les mécanismes de résistance à la cisplatine. En effet, l'utilisation de ces inhibiteurs pourrait empêcher les cellules tumorales de développer des mécanismes de survie face aux agents cytotoxique. Il reste cependant un enjeu majeur dans l'utilisation d'inhibiteur spécifiques. En effet il n'existe pas encore d'inhibiteur spécifique et efficace de l'activité de YAP validé *in vitro* et *in vivo*. Les inhibiteurs connus de PI3K/AKT/mTOR présentent une haute toxicité, seuls 4 inhibiteurs ont été autorisés par la FDA et indiqués dans le traitement de cancers dans le contexte de thérapies ciblées^{359,360}. Certaines de ces molécules ont été testées dans le cadre d'essais cliniques incluant des patients atteints d'ostéosarcome en rechute. Un essai clinique mené en France a montré l'efficacité supérieur d'une combinaison de rapamycine, l'inhibiteur de mTOR le plus ancien, associé ou non à des cyclophosphamide en comparaison à l'utilisation d'inhibiteurs des tyrosines kinases^{361,362}. De plus, une seconde étude incluant des patients atteint de sarcomes utilisant un autre inhibiteur de mTOR, le ridaforolimus, confirme l'efficacité de cette thérapie ciblée³⁶³.

Enfin, au vu des nombreux phénomènes de résistance accompagnant l'utilisation d'inhibiteurs de la voie PI3K, utiliser ces molécules pour contourner un phénomène de résistance à des agents cytotoxiques pourrait également induire des mécanismes de résistances spécifiques.

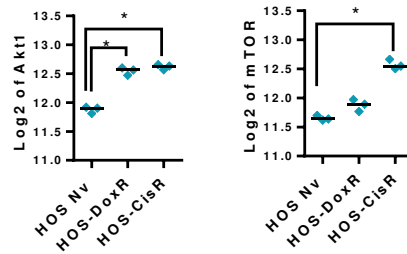


Figure 27 : La résistance à la chimiothérapie semble augmenter la signalisation PI3K dans l'ostéosarcome

Expression médiane exprimée en Log2(FPKM) de Akt1 et mTOR extrait du RNA-sequencing à partir des cellules d'ostéosarcome naïves, résistantes à la doxorubicine ou à la cisplatine.

Les agents cytotoxiques perturbent l'expression de nombreux gènes et induisent de nombreuses mutations dans les cellules tumorales. Les mécanismes de résistance les plus courants sont souvent associés à la réparation de l'ADN et à la détoxification des cellules à l'aide des transporteurs ABC. La combinaison de thérapies cytotoxiques associées à des thérapies ciblées était une théorie très prometteuse dans le traitement des résistances, malheureusement la plupart des inhibiteurs aux transporteurs ABC et les inhibiteurs des PI3K sont très toxiques et ne sont pas retenus après les essais cliniques de phase II. Cibler une protéine en amont telle que YAP à l'aide d'inhibiteurs très spécifiques pourrait diminuer les effets secondaires liés aux toxicités de ces médicaments. Toutefois la production d'inhibiteurs spécifiques de YAP reste un enjeu majeur en pharmacologie.²¹⁶

3) YAP et la matrice extracellulaire

Le microenvironnement tumoral joue un rôle déterminant dans les phénomènes de résistance. La voie de signalisation Hippo étant sensible aux changements de rigidité de la MEC, il semble pertinent d'étudier d'éventuels changements dans l'expression de gènes de la MEC dans les lignées résistantes aux chimiothérapies.³⁶⁴ De façon particulièrement intéressante, les cellules résistantes aux chimiothérapies présentent une augmentation de l'expression de gènes participant à la formation de la MEC tels que Col5A2, Col7A1, FBN1 et

FBN2 (Figure 28). Ces résultats préliminaires sont à mettre en parallèle avec nos données obtenues précédemment. Nous avons montré que l'utilisation d'un modèle cellulaire de surexpression de YAP *in vivo* s'accompagne d'une formation excessive de MEC associé à l'expression de nombreux gènes de la matrice. Ces nouvelles données sont particulièrement intéressantes, la MEC jouant un rôle majeur dans le microenvironnement tumoral. Dans les tumeurs solides l'augmentation de la MEC crée une barrière physique entre les cellules souches tumorales et les agents de chimiothérapie. Ces données sont particulièrement vraies dans le contexte de l'ostéosarcome dans lequel le microenvironnement tumoral et les composants de la MEC jouent un rôle prédominant dans la progression tumorale^{276,365}.

Un cercle vicieux pourrait s'établir entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. YAP en stimulant une production excessive de matrice désensibilise les cellules tumorales aux agents de chimiothérapie et rigidifie le milieu extracellulaire ce qui s'accompagne de la nucléarisation de YAP, qui à son tour induit une production de MEC. Cibler YAP à l'aide d'un inhibiteur pharmacologique pourrait inhiber la production de MEC favorable à la fois la migration cellulaire et à la résistance aux chimiothérapies.

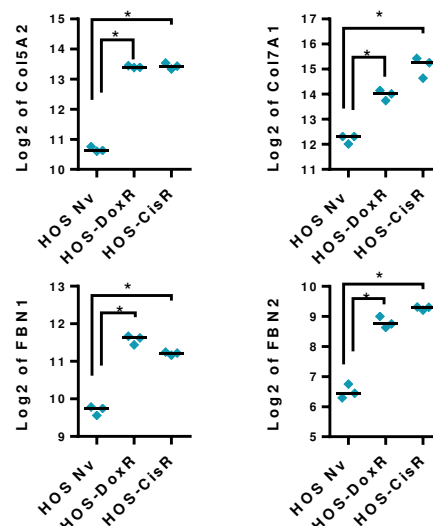


Figure 28 : La résistance à la chimiothérapie semble augmenter l'expression de gènes de la MEC dans l'ostéosarcome

Expression médiane exprimée en Log2(FPKM) de Col5A2, Col7A1, FBN1 et FBN2 extrait du RNA-sequencing à partir des cellules d'ostéosarcome naïves, résistantes à la doxorubicine ou à la cisplatine.

4) YAP et le cytosquelette d'actine

Etant donné nos précédents résultats associant YAP au remodelage du cytosquelette d'actine dans l'ostéosarcome, et les données indiquant le rôle du remodelage du cytosquelette d'actine dans les phénomènes de résistance^{366,367}, nous avons analysé l'expression de gènes clés de ce processus dans les lignées résistantes. De manière particulièrement intéressante, certains gènes impliqués dans la formation de fibres de stress tels que PAK3 ou ACTN1, ou d'autres gènes impliqués dans l'adhésion du cytosquelette avec la matrice tels que ITGB8 ou ITGAE, sont largement surexprimés dans les cellules résistantes aux chimiothérapies³⁶⁸⁻³⁷¹ (Figure 29).

Ces résultats encourageants pourraient expliquer un mécanisme par lequel la voie Hippo confère une résistance aux agents cytotoxiques. Il sera nécessaire de confirmer ces résultats au niveau transcriptomique et protéique.

De façon intéressante nous avons démontré dans nos travaux le rôle de YAP dans la formation de MEC et dans le remodelage du cytosquelette d'actine dans l'ostéosarcome. Ensemble, ces données semblent en accord avec une étude publiée en 2016 par Kim et al. Ils ont montré que la régulation de la YAP par des mécanismes de mécanotransduction était essentielle dans les phénomènes de résistance. Deux événements se produisent dans les cellules de mélanome BRAF mutante à mesure qu'elles acquièrent une résistance à l'inhibiteur de BRAF : la formation de fibre de stress d'actine s'accompagnant de la nucléarisation de YAP²²⁵. Il semble que l'activation de YAP soit la conséquence d'une augmentation de la rigidité de la MEC.

Il est admis que la formation excessive de fibre de stress nucléarise YAP¹²⁴ et on peut encore une fois imaginer une boucle de rétrocontrôle positive entre l'activité de YAP et le remodelage du cytosquelette. Ce processus pourrait permettre aux cellules tumorales, en plus de migrer et métastaser, d'échapper aux agents de chimiothérapie.

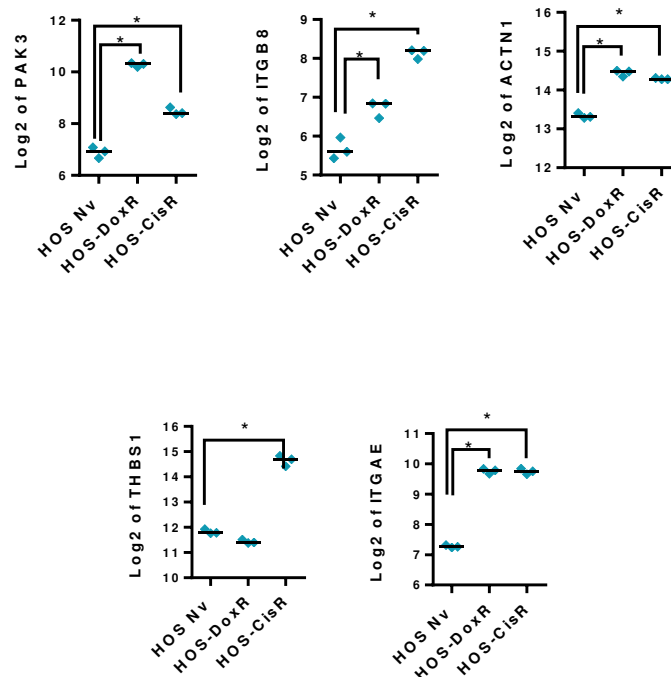


Figure 29 : La résistance à la chimiothérapie semble augmenter l'expression de gènes du cytosquelette dans l'ostéosarcome

Expression médiane exprimée en Log2(FPKM) de PAK3, ITGB8, ACTN1, THBS1 et ITGAE extrait du RNA-seq à partir des cellules d'ostéosarcome naïves, résistantes à la doxorubicine ou à la cisplatine.

Ces résultats sont très encourageants et nous confortent à étudier le rôle de YAP et de la voie dans les mécanismes moléculaires entraînant la résistance aux agents de chimiothérapie.

B. Etude d'un inhibiteur de YAP dans la résistance de l'ostéosarcome aux agents cytotoxiques.

Etant donné les études déjà publiées sur le rôle de YAP dans certains mécanismes de résistance, et les résultats préliminaires des lignées d'ostéosarcome résistantes à la cisplatine et doxorubicine, nous avons commencé à étudier l'inhibition de YAP en synergie avec ces agents cytotoxiques, à l'aide d'une nouvelle molécule, le CA3 (Figure 30A). Cette molécule a été découverte récemment pour son rôle d'inhibiteur de l'interaction YAP/TEAD dans le contexte de l'adénocarcinome de l'œsophage³⁷². De façon particulièrement intéressante, le CA3 présente non seulement une forte efficacité d'inhibition de la croissance tumorale dans ce cancer, mais aussi potentialise la réponse aux agents de chimiothérapie ou l'on observe

une rémission de la tumeur. Au vu de l'intérêt de l'inhibition de YAP dans l'ostéosarcome et des effets synergiques du CA3 l'adénocarcinome de l'œsophage, nous nous sommes intéressés au potentiel de cette molécule dans l'ostéosarcome, et plus particulièrement dans la réponse aux agents de chimiothérapie³⁷².

Des expériences préliminaires de PLA montrent que le CA3 est capable d'inhiber les interactions YAP/TEAD dans l'ostéosarcome (Figure 30B). Des expériences de RT-qPCR sur les gènes cibles de YAP, Cyr61 et CTGF, montrent que cette inhibition est fonctionnelle (Figure 30C). La croissance tumorale étant l'un des processus clés du développement tumoral, nous avons étudié l'effet du CA3 sur la prolifération *in vitro* des cellules d'ostéosarcome. L'analyse de la prolifération cellulaire en cristal violet révèle le rôle cytotoxique du CA3 dans l'ostéosarcome, s'accompagnant d'un blocage du cycle cellulaire en phase G2M (Figure 30D et 30E). Enfin, l'analyse par cytométrie en flux montre que le CA3 induit l'apoptose dans les cellules d'ostéosarcome *in vitro* (Figure 30F). Ces résultats sont confirmés grâce à des tests d'activité des caspases 3/7 après 24H de traitement au CA3. Nos résultats indiquent l'augmentation de l'activité de ces caspases après le traitement au CA3 de façon dose dépendante (Figure 30G).

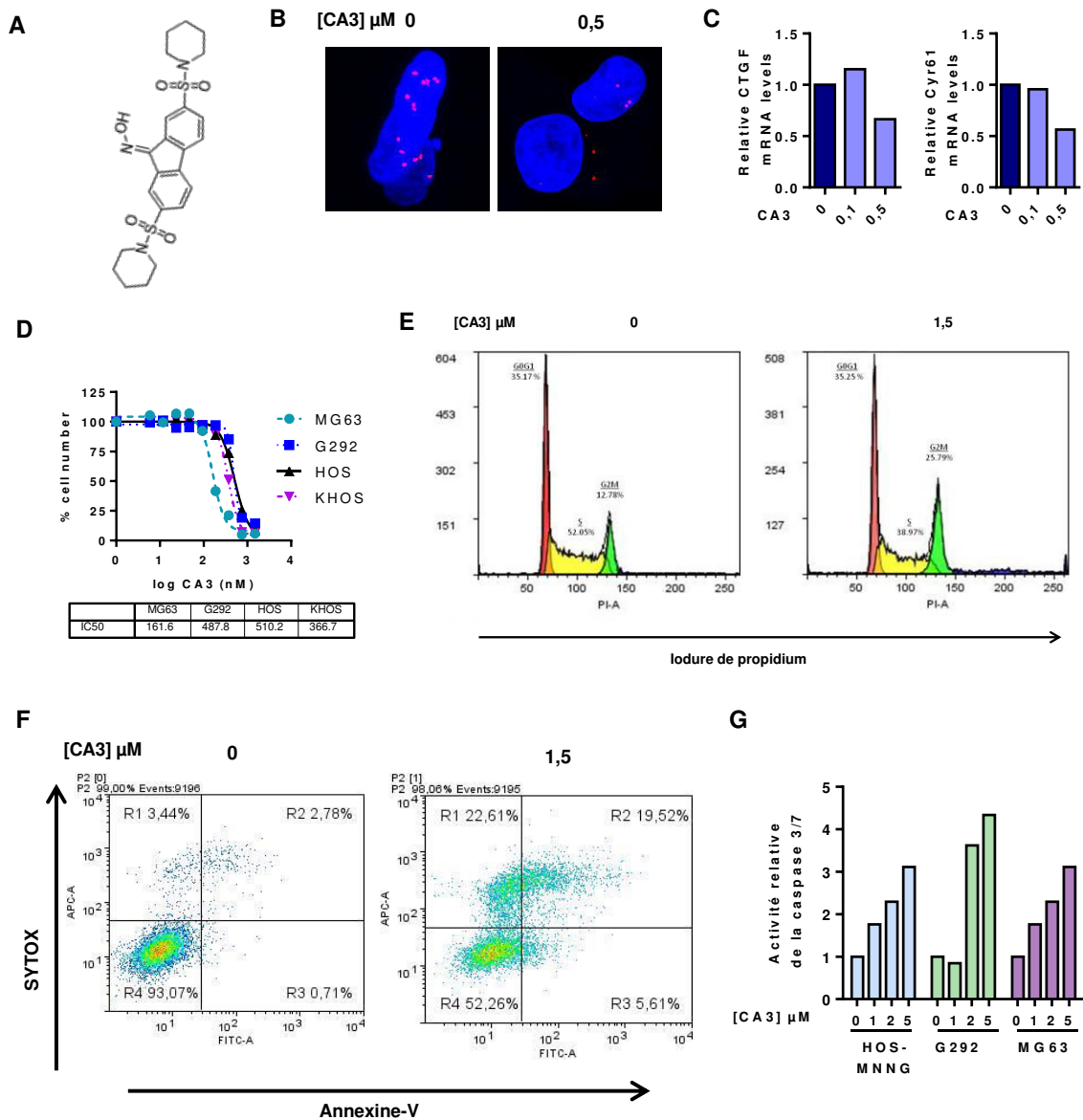


Figure 30 : Le CA3 semble inhiber la voie de signalisation Hippo et la prolifération cellulaire *in vitro* dans l'ostéosarcome

A Représentation d'une molécule de verteporfine. **B** Des cellules HOS-MNNG ont été traitées 24H avec ou sans CA3 (0.5 μM), les ponctuations représentent la forte proximité entre les protéines YAP et TEAD déterminée par proximity ligation assay. **C** Des cellules HOS-MNNG ont été traitées 6H au CA3 aux doses indiquées. Le niveau d'expression relatif de l'ARNm d'un gène cible spécifique de la voie Hippo, Cyr61 a été déterminé par RT-PCR quantitative. **D** Trois lignées d'ostéosarcome HOS-MNNG, MG-63 et G-292 ont été traitées au CA3, un cristal violet a été réalisé après 72H. **E** Des cellules HOS-MNNG ont été traitées 16H au CA3 à une dose de 1,5 μM . Elles ont été ensuite marquées à l'iodure de propidium, un intercalant de l'ADN, puis analysées en cytométrie de flux. Les différentes phases du cycle cellulaire sont représentées avec les pourcentages de cellules dans chaque phase du cycle. **F** Des cellules HOS-MNNG ont été traitées 16H au CA3 à une dose de 1,5 μM . Elles ont été ensuite marquées à l'Annexine-V FITC et au SYTOX red, puis analysées en cytométrie de flux. **G** Des cellules d'ostéosarcome HOS-MNNG, MG-63 et G-292 ont été traitées 24H au CA3 aux doses indiquées, l'activité des caspases 3 et 7 ont été mesurées et sont représentées sur les histogrammes

Le CA3 potentialisant la réponse aux agents de chimiothérapie dans le contexte de l'adénocarcinome de l'œsophage et au vu des résultats obtenus dans les cellules résistantes à la cisplatine, nous avons étudié les effets de l'association du CA3 avec cet agent de chimiothérapie.

Après 48H de traitement au CA3, à la cisplatine, ou avec une combinaison des deux drogues, on observe une inhibition de la prolifération cellulaire à des doses où ces deux drogues n'ont habituellement peu d'effets. La méthode analytique de Chou-Talalay nous a permis d'identifier une synergie des deux molécules sur l'inhibition de la prolifération cellulaire *in vitro*³⁷³(Figure 31A). Ces résultats nous confortent dans l'idée d'étudier les effets de cette nouvelle molécule seule ou en association avec des agents de chimiothérapie dans l'ostéosarcome. Nous avons initié des expérimentations préliminaires *in vivo* dans un modèle murin d'ostéosarcome afin de déterminer les doses d'inhibiteur à utiliser. Ce premier résultat montre l'efficacité du CA3 à inhiber la croissance tumorale *in vivo* dans l'ostéosarcome (Figure 32B).

Grâce à des expérimentations de prolifération cellulaire *in vitro* et de croissance tumorale *in vivo*, nous avons pu déterminer les doses d'agents de chimiothérapie adaptées à un modèle murin d'ostéosarcome (Figure 31C et 31D). En effet, il serait pertinent d'étudier dans premier temps l'effet potentialisant du CA3 *in vivo* en association avec ces chimiothérapies, puis d'étudier l'efficacité du CA3 *in vivo* et *in vitro* dans les modèles cellulaires de lignées résistantes aux chimiothérapies. Des études de combinaisons des différentes drogues pourraient nous apporter de nouvelles informations essentielles dans le domaine de la résistance à la chimiothérapie des cellules d'ostéosarcome.

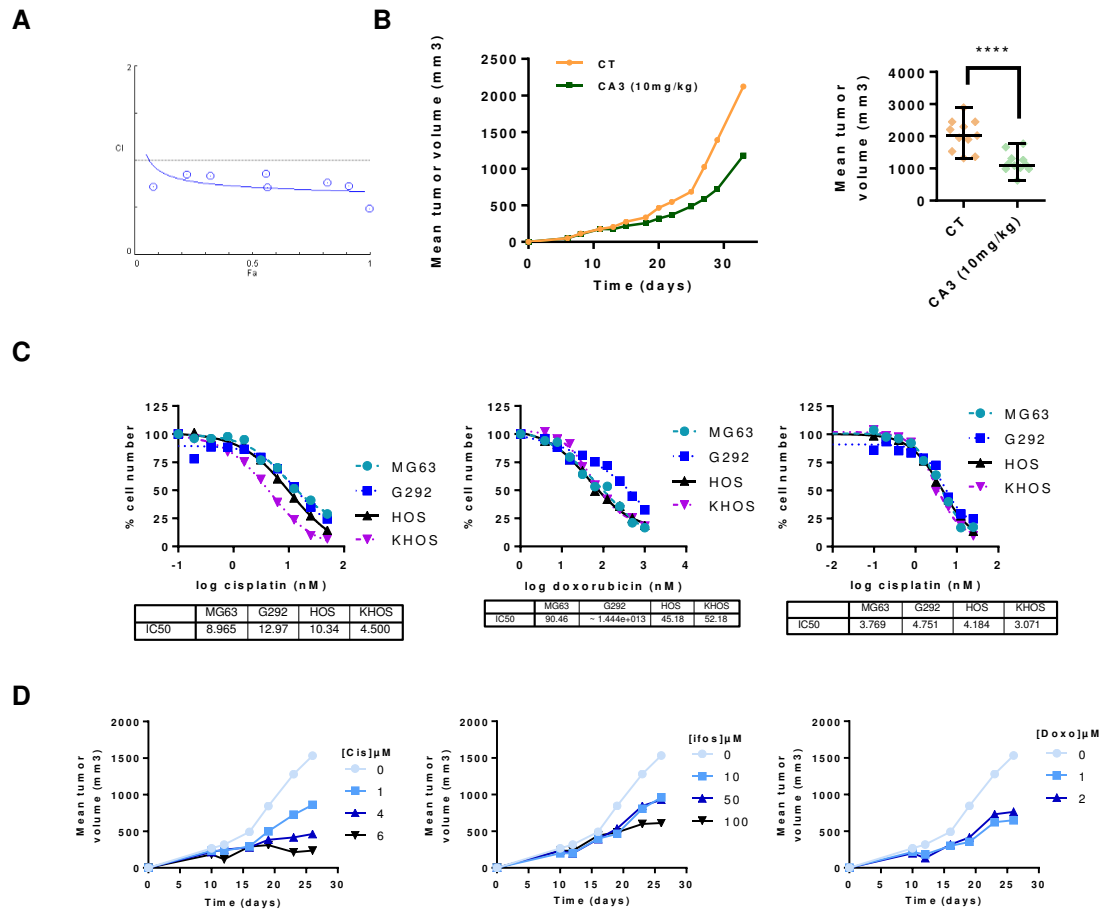


Figure 31 : Le CA3 inhibe la croissance tumorale de l'ostéosarcome *in vivo* et semble avoir un effet synergique avec la cisplatine sur la prolifération cellulaire *in vitro*.

A. Des cellules d'ostéosarcome KHOS ont été traitées au CA3/cisplatine pendant 48H, un test de prolifération au cristal violet a été effectué. Les résultats sont obtenus grâce au logiciel calcuSYN. **B.** Un million de cellules d'ostéosarcome HOS-MNNG ont été injectées en site para-tibial à des souris nude. 10 jours après injections, les souris ont été traitées deux fois par semaine au CA3 par injection intra péritonéale à la dose de 5 mg/kg ou avec du NaCl 0,9% + DMSO pour le groupe contrôle. Les volumes tumoraux ont été mesurés à partir du 1er jour et jusqu'au 30ème jour. **C.** Quatre lignées d'ostéosarcome HOS-MNNG, KHOS, MG-63 et G-292 ont été traitées à la cisplatine, doxorubicine et ifosfamide, un cristal violet a été réalisé après 72H. **D.** Un million de cellules d'ostéosarcome KHOS ont été injectées en site para-tibial à des souris nude. 10 jours après injections, les souris ont été traitées deux fois par semaine à la cisplatine aux doses de 1, 4, et 6 mg/kg, à l'ifosfamide aux doses de 10, 50 et 100mg/kg et à la doxorubicine aux doses de 1 et 2 mg/kg par injection intra péritonéale, ou avec du NaCl 0,9% pour le groupe contrôle. Les volumes tumoraux ont été mesurés à partir du 1er jour et jusqu'au 30ème jour.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'ostéosarcome est la principale tumeur osseuse primitive maligne chez les enfants et les adolescents pour qui le pronostic reste mauvais, en particulier lorsque des métastases sont présentes au diagnostic. Nos travaux ont montré la corrélation entre la survie de patients atteints d'ostéosarcome et l'expression de gènes cibles de la voie de signalisation Hippo. Ces résultats suggèrent l'intérêt de cibler la voie de signalisation Hippo et notamment son effecteur YAP dans le traitement de l'ostéosarcome.

A l'aide de différents modèles cellulaires d'ostéosarcome surexprimant différentes formes de YAP mutées, capables ou non d'interagir avec TEAD, nos travaux ont montré : i) le rôle majeur de TEAD dans la prolifération cellulaire et la croissance tumorale de l'ostéosarcome médié par YAP. ii) le rôle de YAP dans la dissémination métastatique de l'ostéosarcome indépendamment de son interaction avec TEAD. iii) l'existence des complexes YAP/Smad3 et YAP/ β -caténine fonctionnels induisant la transcription de gènes impliqués dans la migration, l'invasion, le remodelage de la MEC et du cytosquelette d'actine, processus clés de la dissémination métastatique.

De plus, L'utilisation de la vertéporfine, une benzoporphyrine connue pour son potentiel inhibiteur de la voie de signalisation Hippo, inhibe la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* dans l'ostéosarcome, ainsi que la migration cellulaire *in vitro* et la dissémination métastatique *in vivo* induite par le TGF- β .

Enfin, des résultats préliminaires indiquent un rôle potentiel de YAP dans certains mécanismes de résistances aux agents de chimiothérapie utilisés dans le traitement de l'ostéosarcome.

Ensemble, ces résultats ont défini le rôle spécifique de TEAD et Smad3 dans la progression tumorale de l'ostéosarcome, et permis l'identification de YAP comme un acteur central du développement de cette pathologie. Ainsi, YAP pourrait être une cible thérapeutique prometteuse dans l'ostéosarcome.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Marie, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 98–105 (2008).
2. Katagiri, T. & Takahashi, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.* **8**, 147–159 (2002).
3. Siddiqui, J. A. & Partridge, N. C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology* **31**, 233–245 (2016).
4. Hadjidakis, D. J. & Androulakis, I. I. Bone Remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1092**, 385–396 (2006).
5. Kenkre, J. & Bassett, J. The bone remodelling cycle. *Ann. Clin. Biochem. Int. J. Lab. Med.* **55**, 308–327 (2018).
6. Geller, D. S. & Gorlick, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* **8**, 705–718 (2010).
7. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **152**, 3–13 (2009).
8. Mirabello, L., Troisi, R. J. & Savage, S. A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer* **125**, 229–234 (2009).
9. Casali, P. G. *et al.* Bone sarcomas: ESMO–PaedCan–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann. Oncol.* **29**, iv79–iv95 (2018).
10. Moore, D. D. & Luu, H. H. Osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **162**, 65–92 (2014).
11. Zhang, Y. *et al.* Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **16**, 6228–6237 (2018).

12. Duchman, K. R., Gao, Y. & Miller, B. J. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol.* **39**, 593–599 (2015).
13. Bielack, S. S. *et al.* Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **20**, 776–790 (2002).
14. Guillon, M. A. M. *et al.* Clinical characteristics and prognosis of osteosarcoma in young children: a retrospective series of 15 cases. *BMC Cancer* **11**, 407 (2011).
15. Mohseny, A. B. & Hogendoorn, P. C. W. Concise review: mesenchymal tumors: when stem cells go mad. *Stem Cells Dayt. Ohio* **29**, 397–403 (2011).
16. Wagner, E. R. *et al.* Defective osteogenic differentiation in the development of osteosarcoma. *Sarcoma* **2011**, 325238 (2011).
17. Gianferante, D. M., Mirabello, L. & Savage, S. A. Germline and somatic genetics of osteosarcoma - connecting aetiology, biology and therapy. *Nat. Rev. Endocrinol.* **13**, 480–491 (2017).
18. Rickel, K., Fang, F. & Tao, J. Molecular genetics of osteosarcoma. *Bone* **102**, 69–79 (2017).
19. Gennari, L., Rendina, D., Falchetti, A. & Merlotti, D. Paget's Disease of Bone. *Calcif. Tissue Int.* **104**, 483–500 (2019).
20. Fujiwara, T. *et al.* Second primary osteosarcomas in patients with retinoblastoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **45**, 1139–1145 (2015).
21. Yamanaka, R. & Hayano, A. Secondary Craniofacial Sarcomas Following Retinoblastoma: A Systematic Review. *World Neurosurg.* **101**, 722-730.e4 (2017).
22. Correa, H. Li-Fraumeni Syndrome. *J. Pediatr. Genet.* **5**, 84–88 (2016).

23. Geary, R. L., Corrigan, L. R., Carney, D. N. & Higgins, M. J. Osteosarcoma and second malignant neoplasms: a case series. *Ir. J. Med. Sci.* (2019) doi:10.1007/s11845-019-02027-2.
24. Hameed, M. & Mandelker, D. Tumor Syndromes Predisposing to Osteosarcoma. *Adv. Anat. Pathol.* **25**, 217–222 (2018).
25. Appelman-Dijkstra, N. M. & Papapoulos, S. E. Paget's disease of bone. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **32**, 657–668 (2018).
26. Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J. & Thomas, D. M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 722–735 (2014).
27. Fuchs, B. & Pritchard, D. J. Etiology of osteosarcoma. *Clin. Orthop.* 40–52 (2002) doi:10.1097/00003086-200204000-00007.
28. Simpson, E. & Brown, H. L. Understanding osteosarcomas. *JAAPA Off. J. Am. Acad. Physician Assist.* **31**, 15–19 (2018).
29. Kager, L., Tamamyran, G. & Bielack, S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* **13**, 357–368 (2017).
30. Gomez-Brouchet, A. *et al.* Rôle du pathologiste dans la prise en charge des tumeurs osseuses primitives malignes : ostéosarcomes et tumeurs de la famille Ewing après traitement néoadjuvant. *Ann. Pathol.* **31**, 455–465 (2011).
31. Huvos, A. G., Rosen, G. & Marcove, R. C. Primary osteogenic sarcoma: pathologic aspects in 20 patients after treatment with chemotherapy en bloc resection, and prosthetic bone replacement. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **101**, 14–18 (1977).
32. Luetke, A., Meyers, P. A., Lewis, I. & Juergens, H. Osteosarcoma treatment - where do we stand? A state of the art review. *Cancer Treat. Rev.* **40**, 523–532 (2014).

33. Gaspar, N. *et al.* Results of methotrexate-etoposide-ifosfamide based regimen (M-EI) in osteosarcoma patients included in the French OS2006/sarcome-09 study. *Eur. J. Cancer* **88**, 57–66 (2018).
34. Allison, D. C. *et al.* A meta-analysis of osteosarcoma outcomes in the modern medical era. *Sarcoma* **2012**, 704872 (2012).
35. Taylor, M. F. & Pooley, J. A. Sarcoma survivors' perspectives on their body image and functional quality of life post-resection/limb salvage surgery. *Eur. J. Cancer Care (Engl.)* **26**, (2017).
36. Miller, B. J., Lynch, C. F. & Buckwalter, J. A. Conditional survival is greater than overall survival at diagnosis in patients with osteosarcoma and Ewing's sarcoma. *Clin. Orthop.* **471**, 3398–3404 (2013).
37. Piperno-Neumann, S. *et al.* Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 1070–1080 (2016).
38. Isakoff, M. S., Bielack, S. S., Meltzer, P. & Gorlick, R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 3029–3035 (2015).
39. Marko, T. A., Diessner, B. J. & Spector, L. G. Prevalence of Metastasis at Diagnosis of Osteosarcoma: An International Comparison. *Pediatr. Blood Cancer* **63**, 1006–1011 (2016).
40. Duffaud, F. *et al.* Efficacy and safety of regorafenib in adult patients with metastatic osteosarcoma: a non-comparative, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study. *Lancet Oncol.* **20**, 120–133 (2019).

41. Brard, C. *et al.* Sarcome-13/OS2016 trial protocol: a multicentre, randomised, open-label, phase II trial of mifamurtide combined with postoperative chemotherapy for patients with newly diagnosed high-risk osteosarcoma. *BMJ Open* **9**, (2019).
42. Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M. & Bryant, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes Dev.* **9**, 534–546 (1995).
43. Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R. A. & Yu, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Dev. Camb. Engl.* **121**, 1053–1063 (1995).
44. Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* **19**, 491–505 (2010).
45. Harvey, K. F. & Hariharan, I. K. The hippo pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a011288 (2012).
46. Genevet, A. & Tapon, N. The Hippo pathway and apico-basal cell polarity. *Biochem. J.* **436**, 213–224 (2011).
47. Tapon, N. *et al.* *salvador* Promotes both cell cycle exit and apoptosis in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Cell* **110**, 467–478 (2002).
48. Kango-Singh, M. *et al.* *Shar-pei* mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 5719–5730 (2002).
49. Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. & Pan, D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* Homolog of YAP. *Cell* **122**, 421–434 (2005).

50. Wu, S., Liu, Y., Zheng, Y., Dong, J. & Pan, D. The TEAD/TEF family protein Scalloped mediates transcriptional output of the Hippo growth-regulatory pathway. *Dev. Cell* **14**, 388–398 (2008).
51. Zhang, L. *et al.* The TEAD/TEF family of transcription factor Scalloped mediates Hippo signaling in organ size control. *Dev. Cell* **14**, 377–387 (2008).
52. Sudol, M. Yes-associated protein (YAP65) is a proline-rich phosphoprotein that binds to the SH3 domain of the Yes proto-oncogene product. *Oncogene* **9**, 2145–2152 (1994).
53. Dong, J. *et al.* Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* **130**, 1120–1133 (2007).
54. Nishioka, N. *et al.* The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophectoderm from inner cell mass. *Dev. Cell* **16**, 398–410 (2009).
55. McPherson, J. P. *et al.* Lats2/Kpm is required for embryonic development, proliferation control and genomic integrity. *EMBO J.* **23**, 3677–3688 (2004).
56. St John, M. A. *et al.* Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nat. Genet.* **21**, 182–186 (1999).
57. Zhao, B. *et al.* TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev.* **22**, 1962–1971 (2008).
58. Boggiano, J. C., Vanderzalm, P. J. & Fehon, R. G. Tao-1 Phosphorylates Hippo/MST Kinases to Regulate the Hippo-Salvador-Warts Tumor Suppressor Pathway. *Dev. Cell* **21**, 888–895 (2011).
59. Poon, C. L. C., Lin, J. I., Zhang, X. & Harvey, K. F. The Sterile 20-like Kinase Tao-1 Controls Tissue Growth by Regulating the Salvador-Warts-Hippo Pathway. *Dev. Cell* **21**, 896–906 (2011).

60. Harvey, K. F., Pflieger, C. M. & Hariharan, I. K. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* **114**, 457–467 (2003).
61. Jia, J., Zhang, W., Wang, B., Trinko, R. & Jiang, J. The *Drosophila* Ste20 family kinase dMST functions as a tumor suppressor by restricting cell proliferation and promoting apoptosis. *Genes Dev.* **17**, 2514–2519 (2003).
62. Piccolo, S., Dupont, S. & Cordenonsi, M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* **94**, 1287–1312 (2014).
63. Moon, S., Yeon Park, S. & Woo Park, H. Regulation of the Hippo pathway in cancer biology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **75**, 2303–2319 (2018).
64. Robinson, B. S., Huang, J., Hong, Y. & Moberg, K. H. Crumbs Regulates Salvador/Warts/Hippo Signaling in *Drosophila* via the FERM-Domain Protein Expanded. *Curr. Biol.* **20**, 582–590 (2010).
65. McCartney, B. M., Kulikaukas, R. M., LaJeunesse, D. R. & Fehon, R. G. The neurofibromatosis-2 homologue, Merlin, and the tumor suppressor expanded function together in *Drosophila* to regulate cell proliferation and differentiation. *Dev. Camb. Engl.* **127**, 1315–1324 (2000).
66. Xiao, J. H., Davidson, I., Matthes, H., Garnier, J. M. & Chambon, P. Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1. *Cell* **65**, 551–568 (1991).
67. Vassilev, A., Kaneko, K. J., Shu, H., Zhao, Y. & DePamphilis, M. L. TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm. *Genes Dev.* **15**, 1229–1241 (2001).
68. Chen, L. *et al.* Structural basis of YAP recognition by TEAD4 in the hippo pathway. *Genes Dev.* **24**, 290–300 (2010).

69. Kim, M.-K., Jang, J.-W. & Bae, S.-C. DNA binding partners of YAP/TAZ. *BMB Rep.* **51**, 126–133 (2018).
70. Yang, A. *et al.* p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**, 99–103 (2000).
71. Basu, S., Totty, N. F., Irwin, M. S., Sudol, M. & Downward, J. Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol. Cell* **11**, 11–23 (2003).
72. Komuro, A., Nagai, M., Navin, N. E. & Sudol, M. WW domain-containing protein YAP associates with ErbB-4 and acts as a co-transcriptional activator for the carboxyl-terminal fragment of ErbB-4 that translocates to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **278**, 33334–33341 (2003).
73. Ferrigno, O. *et al.* Yes-associated protein (YAP65) interacts with Smad7 and potentiates its inhibitory activity against TGF- β /Smad signaling. *Oncogene* **21**, 4879–4884 (2002).
74. Strano, S. *et al.* Physical interaction with Yes-associated protein enhances p73 transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* **276**, 15164–15173 (2001).
75. Nemaierova, A. & Moll, U. M. Tissue-specific roles of p73 in development and homeostasis. *J. Cell Sci.* **132**, (2019).
76. Cottini, F. *et al.* Rescue of Hippo coactivator YAP1 triggers DNA damage-induced apoptosis in hematological cancers. *Nat. Med.* **20**, 599–606 (2014).
77. Levy, D., Adamovich, Y., Reuven, N. & Shaul, Y. 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 (2008).
78. Komori, T. *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).

79. Otto, F. *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765–771 (1997).
80. Yagi, R., Chen, L. F., Shigesada, K., Murakami, Y. & Ito, Y. A WW domain-containing yes-associated protein (YAP) is a novel transcriptional co-activator. *EMBO J.* **18**, 2551–2562 (1999).
81. Hong, J.-H. *et al.* TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science* **309**, 1074–1078 (2005).
82. Marzia, M. *et al.* Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J. Cell Biol.* **151**, 311–320 (2000).
83. Danieau, G., Morice, S., Rédini, F., Verrecchia, F. & Royer, B. B.-L. New Insights about the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies? *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
84. Piersma, B., Bank, R. A. & Boersema, M. Signaling in Fibrosis: TGF- β , WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front. Med.* **2**, 59 (2015).
85. Murakami, M., Nakagawa, M., Olson, E. N. & Nakagawa, O. A WW domain protein TAZ is a critical coactivator for TBX5, a transcription factor implicated in Holt-Oram syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18034–18039 (2005).
86. Rosenbluh, J. *et al.* β -Catenin-Driven Cancers Require a YAP1 Transcriptional Complex for Survival and Tumorigenesis. *Cell* **151**, 1457–1473 (2012).
87. Varelas, X. *et al.* The Hippo pathway regulates Wnt/ β -catenin signaling. *Dev. Cell* **18**, 579–591 (2010).
88. Azzolin, L. *et al.* Role of TAZ as Mediator of Wnt Signaling. *Cell* **151**, 1443–1456 (2012).
89. Azzolin, L. *et al.* YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **158**, 157–170 (2014).

90. Park, H. W. *et al.* Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell* **162**, 780–794 (2015).
91. Jonk, L. J., Itoh, S., Heldin, C. H., ten Dijke, P. & Kruijer, W. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J. Biol. Chem.* **273**, 21145–21152 (1998).
92. Tang, Y. *et al.* TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat. Med.* **15**, 757–765 (2009).
93. Wan, M. *et al.* Injury-activated transforming growth factor β controls mobilization of mesenchymal stem cells for tissue remodeling. *Stem Cells Dayt. Ohio* **30**, 2498–2511 (2012).
94. Pfeilschifter, J. *et al.* Chemotactic response of osteoblastlike cells to transforming growth factor beta. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **5**, 825–830 (1990).
95. Xie, F., Ling, L., van Dam, H., Zhou, F. & Zhang, L. TGF- β signaling in cancer metastasis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **50**, 121–132 (2018).
96. Derynck, R., Akhurst, R. J. & Balmain, A. TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* **29**, 117–129 (2001).
97. Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
98. Varelas, X. *et al.* TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **10**, 837–848 (2008).
99. Nallet-Staub, F. *et al.* Cell density sensing alters TGF- β signaling in a cell-type-specific manner, independent from Hippo pathway activation. *Dev. Cell* **32**, 640–651 (2015).

100. Fujii, M. *et al.* Convergent signaling in the regulation of connective tissue growth factor in malignant mesothelioma: TGF β signaling and defects in the Hippo signaling cascade. *Cell Cycle Georget. Tex* **11**, 3373–3379 (2012).
101. Grannas, K. *et al.* Crosstalk between Hippo and TGF β : Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. *J. Mol. Biol.* **427**, 3407–3415 (2015).
102. Liu, F. *et al.* Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **308**, L344-357 (2015).
103. Hiemer, S. E., Szymaniak, A. D. & Varelas, X. The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor β -induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **289**, 13461–13474 (2014).
104. Rashidian, J. *et al.* Ski regulates Hippo and TAZ signaling to suppress breast cancer progression. *Sci. Signal.* **8**, ra14 (2015).
105. Pefani, D.-E. *et al.* TGF- β Targets the Hippo Pathway Scaffold RASSF1A to Facilitate YAP/SMAD2 Nuclear Translocation. *Mol. Cell* **63**, 156–166 (2016).
106. Chen, C.-L. *et al.* The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15810–15815 (2010).
107. Grzeschik, N. A., Parsons, L. M., Allott, M. L., Harvey, K. F. & Richardson, H. E. Lgl, aPKC, and Crumbs Regulate the Salvador/Warts/Hippo Pathway through Two Distinct Mechanisms. *Curr. Biol.* **20**, 573–581 (2010).
108. Ling, C. *et al.* The apical transmembrane protein Crumbs functions as a tumor suppressor that regulates Hippo signaling by binding to Expanded. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 10532–10537 (2010).

109. Hamaratoglu, F. *et al.* The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **8**, 27–36 (2006).
110. Baumgartner, R., Poernbacher, I., Buser, N., Hafen, E. & Stocker, H. The WW Domain Protein Kibra Acts Upstream of Hippo in Drosophila. *Dev. Cell* **18**, 309–316 (2010).
111. Yu, J. *et al.* Kibra Functions as a Tumor Suppressor Protein that Regulates Hippo Signaling in Conjunction with Merlin and Expanded. *Dev. Cell* **18**, 288–299 (2010).
112. Kim, N.-G., Koh, E., Chen, X. & Gumbiner, B. M. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 11930–11935 (2011).
113. Schlegelmilch, K. *et al.* Yap1 Acts Downstream of α -Catenin to Control Epidermal Proliferation. *Cell* **144**, 782–795 (2011).
114. Silvis, M. R. *et al.* 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–ra33 (2011).
115. Zhao, B. *et al.* Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev.* **25**, 51–63 (2011).
116. Oka, T. *et al.* Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem. J.* **432**, 461–478 (2010).
117. Yi, C. *et al.* A tight junction-associated Merlin-angiomotin complex mediates Merlin's regulation of mitogenic signaling and tumor suppressive functions. *Cancer Cell* **19**, 527–540 (2011).

118. Serrano, I., McDonald, P. C., Lock, F., Muller, W. J. & Dedhar, S. Inactivation of the Hippo tumour suppressor pathway by integrin-linked kinase. *Nat. Commun.* **4**, 1–12 (2013).
119. Kim, N.-G. & Gumbiner, B. M. Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK–Src–PI3K pathway. *J. Cell Biol.* **210**, 503–515 (2015).
120. Discher, D. E., Mooney, D. J. & Zandstra, P. W. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* **324**, 1673–1677 (2009).
121. Zhao, B. *et al.* Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* **21**, 2747–2761 (2007).
122. Aragona, M. *et al.* A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell* **154**, 1047–1059 (2013).
123. Dupont, S. *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–183 (2011).
124. Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S. & Sasaki, H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* **138**, 3907–3914 (2011).
125. Zhao, B. *et al.* Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* **26**, 54–68 (2012).
126. Martinez, B. *et al.* YAP/TAZ Related BioMechano Signal Transduction and Cancer Metastasis. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, (2019).
127. Wei, S. C. *et al.* Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat. Cell Biol.* **17**, 678–688 (2015).
128. Zheng, Y. & Pan, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. *Dev. Cell* **50**, 264–282 (2019).

129. Yu, F.-X. *et al.* Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell* **150**, 780–791 (2012).
130. Yu, F.-X. *et al.* Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes Dev.* **27**, 1223–1232 (2013).
131. Feng, X. *et al.* Hippo-Independent Activation of YAP by the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene through a Trio-Regulated Rho GTPase Signaling Circuitry. *Cancer Cell* **25**, 831–845 (2014).
132. Yu, F.-X. *et al.* Mutant Gq/11 Promote Uveal Melanoma Tumorigenesis by Activating YAP. *Cancer Cell* **25**, 822–830 (2014).
133. Zhou, X., Wang, Z., Huang, W. & Lei, Q.-Y. G protein-coupled receptors: bridging the gap from the extracellular signals to the Hippo pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **47**, 10–15 (2015).
134. DeRan, M. *et al.* Energy Stress Regulates Hippo-YAP Signaling Involving AMPK-Mediated Regulation of Angiotensin-like 1 Protein. *Cell Rep.* **9**, 495–503 (2014).
135. Mo, J.-S. *et al.* Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nat. Cell Biol.* **17**, 500–510 (2015).
136. Wang, W. *et al.* AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nat. Cell Biol.* **17**, 490–499 (2015).
137. Ma, B. *et al.* Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. *Nat. Cell Biol.* **17**, 95–103 (2015).
138. Shao, D. *et al.* A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response. *Nat. Commun.* **5**, 3315 (2014).
139. Davis, J. R. & Tapon, N. Hippo signalling during development. *Development* **146**, dev167106 (2019).

140. Wang, Y., Yu, A. & Yu, F.-X. The Hippo pathway in tissue homeostasis and regeneration. *Protein Cell* **8**, 349–359 (2017).
141. Cockburn, K., Biechele, S., Garner, J. & Rossant, J. The Hippo pathway member Nf2 is required for inner cell mass specification. *Curr. Biol. CB* **23**, 1195–1201 (2013).
142. Hirate, Y. *et al.* Polarity-dependent distribution of angiomin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol. CB* **23**, 1181–1194 (2013).
143. Lorthongpanich, C. *et al.* Temporal reduction of LATS kinases in the early preimplantation embryo prevents ICM lineage differentiation. *Genes Dev.* **27**, 1441–1446 (2013).
144. Camargo, F. D. *et al.* YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Curr. Biol.* **17**, 2054–2060 (2007).
145. Yu, F.-X., Zhao, B. & Guan, K.-L. Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* **163**, 811–828 (2015).
146. Cai, J. *et al.* The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes Dev.* **24**, 2383–2388 (2010).
147. Chen, Q. *et al.* A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis. *Genes Dev.* **28**, 432–437 (2014).
148. Grijalva, J. L. *et al.* Dynamic alterations in Hippo signaling pathway and YAP activation during liver regeneration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **307**, G196-204 (2014).
149. Su, T. *et al.* Two-signal requirement for growth-promoting function of Yap in hepatocytes. *eLife* **4**, (2015).
150. Wu, H. *et al.* The Ets transcription factor GABP is a component of the hippo pathway essential for growth and antioxidant defense. *Cell Rep.* **3**, 1663–1677 (2013).

151. Yimlamai, D. *et al.* Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell* **157**, 1324–1338 (2014).
152. Heallen, T. *et al.* Hippo signaling impedes adult heart regeneration. *Dev. Camb. Engl.* **140**, 4683–4690 (2013).
153. Lin, Z. *et al.* Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circ. Res.* **115**, 354–363 (2014).
154. Xin, M. *et al.* Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 13839–13844 (2013).
155. Lee, J. *et al.* Mst2 Controls Bone Homeostasis by Regulating Osteoclast and Osteoblast Differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **30**, 1597–1607 (2015).
156. Deng, Y. *et al.* Yap1 Regulates Multiple Steps of Chondrocyte Differentiation during Skeletal Development and Bone Repair. *Cell Rep.* **14**, 2224–2237 (2016).
157. Yang, W. *et al.* The emerging role of Hippo signaling pathway in regulating osteoclast formation. *J. Cell. Physiol.* **233**, 4606–4617 (2018).
158. Tang, Y., Feinberg, T., Keller, E. T., Li, X.-Y. & Weiss, S. J. Snail/Slug binding interactions with YAP/TAZ control skeletal stem cell self-renewal and differentiation. *Nat. Cell Biol.* **18**, 917–929 (2016).
159. Wynn, T. A. & Ramalingam, T. R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat. Med.* **18**, 1028–1040 (2012).
160. Piersma, B., Bank, R. A. & Boersema, M. Signaling in Fibrosis: TGF- β , WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front. Med.* **2**, 59 (2015).
161. Leask, A. & Abraham, D. J. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **18**, 816–827 (2004).

162. Noguchi, S., Saito, A. & Nagase, T. YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
163. Kim, C.-L., Choi, S.-H. & Mo, J.-S. Role of the Hippo Pathway in Fibrosis and Cancer. *Cells* **8**, (2019).
164. Sanchez-Vega, F. *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* **173**, 321-337.e10 (2018).
165. Bouvier, C. *et al.* Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β 1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget* **7**, 64702–64710 (2016).
166. Murakami, H. *et al.* LATS2 Is a Tumor Suppressor Gene of Malignant Mesothelioma. *Cancer Res.* **71**, 873–883 (2011).
167. Sekido, Y. Inactivation of Merlin in malignant mesothelioma cells and the Hippo signaling cascade dysregulation. *Pathol. Int.* **61**, 331–344 (2011).
168. Tanas, M. R. *et al.* Identification of a disease-defining gene fusion in epithelioid hemangioendothelioma. *Sci. Transl. Med.* **3**, 98ra82 (2011).
169. Huh, H. D., Kim, D. H., Jeong, H.-S. & Park, H. W. Regulation of TEAD Transcription Factors in Cancer Biology. *Cells* **8**, (2019).
170. Dejana, E., Tournier-Lasserre, E. & Weinstein, B. M. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev. Cell* **16**, 209–221 (2009).
171. Viallard, C. & Larrivée, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis* **20**, 409–426 (2017).
172. Arbiser, J. L. *et al.* Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 861–866 (1997).

173. Govindarajan, B. *et al.* Malignant transformation of melanocytes to melanoma by constitutive activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 9790–9795 (2003).
174. Cho, H.-D. *et al.* Kochia scoparia seed extract suppresses VEGF-induced angiogenesis via modulating VEGF receptor 2 and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Pharm. Biol.* **57**, 684–693 (2019).
175. Glienke, J. *et al.* Differential gene expression by endothelial cells in distinct angiogenic states. *Eur. J. Biochem.* **267**, 2820–2830 (2000).
176. Azad, T., Ghahremani, M. & Yang, X. The Role of YAP and TAZ in Angiogenesis and Vascular Mimicry. *Cells* **8**, (2019).
177. Djonov, V., Baum, O. & Burri, P. H. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **314**, 107–117 (2003).
178. Aase, K. *et al.* Angiomotin regulates endothelial cell migration during embryonic angiogenesis. *Genes Dev.* **21**, 2055–2068 (2007).
179. Skouloudaki, K. & Walz, G. YAP1 recruits c-Abl to protect angiomotin-like 1 from Nedd4-mediated degradation. *PLoS One* **7**, e35735 (2012).
180. Singleton, P. A. *et al.* CD44 regulates hepatocyte growth factor-mediated vascular integrity. Role of c-Met, Tiam1/Rac1, dynamin 2, and cortactin. *J. Biol. Chem.* **282**, 30643–30657 (2007).
181. Stamenkovic, I. & Yu, Q. Merlin, a ‘magic’ linker between extracellular cues and intracellular signaling pathways that regulate cell motility, proliferation, and survival. *Curr. Protein Pept. Sci.* **11**, 471–484 (2010).
182. Nakajima, H. *et al.* Flow-Dependent Endothelial YAP Regulation Contributes to Vessel Maintenance. *Dev. Cell* **40**, 523-536.e6 (2017).

183. Dickson, M. C. *et al.* Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Dev. Camb. Engl.* **121**, 1845–1854 (1995).
184. Oshima, M., Oshima, H. & Taketo, M. M. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* **179**, 297–302 (1996).
185. Larsson, J. *et al.* Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J.* **20**, 1663–1673 (2001).
186. Ma, B. *et al.* Zyxin-Siah2-Lats2 axis mediates cooperation between Hippo and TGF- β signalling pathways. *Nat. Commun.* **7**, 11123 (2016).
187. Li, W. & Kang, Y. Probing the Fifty Shades of EMT in Metastasis. *Trends Cancer* **2**, 65–67 (2016).
188. Yilmaz, M. & Christofori, G. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 15–33 (2009).
189. Derynck, R., Muthusamy, B. P. & Saeteurn, K. Y. Signaling pathway cooperation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* **31**, 56–66 (2014).
190. Lamora, A. *et al.* TGF- β Signaling in Bone Remodeling and Osteosarcoma Progression. *J. Clin. Med.* **5**, (2016).
191. Zhou, B. *et al.* Interactions between β -catenin and transforming growth factor- β signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). *J. Biol. Chem.* **287**, 7026–7038 (2012).
192. Hao, Y., Baker, D. & ten Dijke, P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
193. Gonzalez, D. M. & Medici, D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Sci. Signal.* **7**, re8 (2014).

194. Verrecchia, F. & Rédini, F. Transforming Growth Factor- β Signaling Plays a Pivotal Role in the Interplay Between Osteosarcoma Cells and Their Microenvironment. *Front. Oncol.* **8**, 133 (2018).
195. Lamora, A. *et al.* Anticancer activity of halofuginone in a preclinical model of osteosarcoma: inhibition of tumor growth and lung metastases. *Oncotarget* **6**, 14413–14427 (2015).
196. Lamora, A. *et al.* Overexpression of smad7 blocks primary tumor growth and lung metastasis development in osteosarcoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 5097–5112 (2014).
197. Li, Z. *et al.* The Hippo transducer TAZ promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer stem cell maintenance in oral cancer. *Mol. Oncol.* **9**, 1091–1105 (2015).
198. Overholtzer, M. *et al.* Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12405–12410 (2006).
199. Lei, Q.-Y. *et al.* TAZ Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition and Is Inhibited by the Hippo Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 2426–2436 (2008).
200. Shao, D. D. *et al.* KRAS and YAP1 Converge to Regulate EMT and Tumor Survival. *Cell* **158**, 171–184 (2014).
201. Park, J. *et al.* Switch-like enhancement of epithelial-mesenchymal transition by YAP through feedback regulation of WT1 and Rho-family GTPases. *Nat. Commun.* **10**, 1–15 (2019).
202. Qu, Y. *et al.* Yes-associated protein (YAP) predicts poor prognosis and regulates progression of esophageal squamous cell cancer through epithelial-mesenchymal transition. *Exp. Ther. Med.* **18**, 2993–3001 (2019).

203. Zhang, Y. *et al.* YAP Promotes Migration and Invasion of Human Glioma Cells. *J. Mol. Neurosci. MN* **64**, 262–272 (2018).
204. Chen, W., Bai, Y., Patel, C. & Geng, F. Autophagy promotes triple negative breast cancer metastasis via YAP nuclear localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2019) doi:10.1016/j.bbrc.2019.09.133.
205. Ling, H.-H., Kuo, C.-C., Lin, B.-X., Huang, Y.-H. & Lin, C.-W. Elevation of YAP promotes the epithelial-mesenchymal transition and tumor aggressiveness in colorectal cancer. *Exp. Cell Res.* **350**, 218–225 (2017).
206. Liu, Y. *et al.* YAP modulates TGF- β 1-induced simultaneous apoptosis and EMT through upregulation of the EGF receptor. *Sci. Rep.* **7**, 45523 (2017).
207. Han, H. *et al.* Regulation of the Hippo Pathway by Phosphatidic Acid-Mediated Lipid-Protein Interaction. *Mol. Cell* **72**, 328-340.e8 (2018).
208. Fujimoto, D., Ueda, Y., Hirono, Y., Goi, T. & Yamaguchi, A. PAR1 participates in the ability of multidrug resistance and tumorigenesis by controlling Hippo-YAP pathway. *Oncotarget* **6**, 34788–34799 (2015).
209. Diepenbruck, M. *et al.* Tead2 expression levels control the subcellular distribution of Yap and Taz, zyxin expression and epithelial–mesenchymal transition. *J. Cell Sci.* **127**, 1523–1536 (2014).
210. Kireeva, M. L., Mo, F. E., Yang, G. P. & Lau, L. F. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1326–1334 (1996).
211. Chu, C.-Y., Chang, C.-C., Prakash, E. & Kuo, M.-L. Connective tissue growth factor (CTGF) and cancer progression. *J. Biomed. Sci.* **15**, 675–685 (2008).

212. Huang, J. L.-Y., Urtatiz, O. & Raamsdonk, C. D. V. Oncogenic G Protein GNAQ Induces Uveal Melanoma and Intravasation in Mice. *Cancer Res.* **75**, 3384–3397 (2015).
213. Wu, R. *et al.* Knockdown of the Hippo transducer YAP reduces proliferation and promotes apoptosis in the Jurkat leukemia cell. *Mol. Med. Rep.* **18**, 5379–5388 (2018).
214. Zhao, B. *et al.* Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* **26**, 54–68 (2012).
215. Sharif, G. M. *et al.* Cell growth density modulates cancer cell vascular invasion via Hippo pathway activity and CXCR2 signaling. *Oncogene* **34**, 5879–5889 (2015).
216. Delou, J. M. A., Souza, A. S. O., Souza, L. C. M. & Borges, H. L. Highlights in Resistance Mechanism Pathways for Combination Therapy. *Cells* **8**, 1013 (2019).
217. Lackner, M. R., Wilson, T. R. & Settleman, J. Mechanisms of acquired resistance to targeted cancer therapies. *Future Oncol. Lond. Engl.* **8**, 999–1014 (2012).
218. Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D. B. & Johnston, P. G. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 714–726 (2013).
219. Gujral, T. S. & Kirschner, M. W. Hippo pathway mediates resistance to cytotoxic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E3729–E3738 (2017).
220. Kapoor, A. *et al.* Yap1 activation enables bypass of oncogenic Kras addiction in pancreatic cancer. *Cell* **158**, 185–197 (2014).
221. Zhang, W. *et al.* Downstream of Mutant KRAS, the Transcription Regulator YAP Is Essential for Neoplastic Progression to Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci. Signal.* **7**, ra42 (2014).
222. Chapman, P. B. *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2507–2516 (2011).

223. Robert, C. *et al.* Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N. Engl. J. Med.* **372**, 30–39 (2015).
224. Lin, L. *et al.* The Hippo effector YAP promotes resistance to RAF- and MEK-targeted cancer therapies. *Nat. Genet.* **47**, 250–256 (2015).
225. Kim, M. H. *et al.* Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP/TAZ activation. *EMBO J.* **35**, 462–478 (2016).
226. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949–954 (2002).
227. Wu, S.-G. & Shih, J.-Y. Management of acquired resistance to EGFR TKI-targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* **17**, 38 (2018).
228. Lee, J. E. *et al.* Hippo pathway effector YAP inhibition restores the sensitivity of EGFR-TKI in lung adenocarcinoma having primary or acquired EGFR-TKI resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **474**, 154–160 (2016).
229. Ciamporcero, E. *et al.* YAP activation protects urothelial cell carcinoma from treatment-induced DNA damage. *Oncogene* **35**, 1541–1553 (2016).
230. Xiao, L. *et al.* YAP induces cisplatin resistance through activation of autophagy in human ovarian carcinoma cells. *OncoTargets Ther.* **9**, 1105–1114 (2016).
231. Yoshikawa, K. *et al.* The Hippo pathway transcriptional co-activator, YAP, confers resistance to cisplatin in human oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* **46**, 2364–2370 (2015).
232. Zhou, Y. *et al.* YAP promotes multi-drug resistance and inhibits autophagy-related cell death in hepatocellular carcinoma via the RAC1-ROS-mTOR pathway. *Cancer Cell Int.* **19**, (2019).

233. Mutsaers, A. J. & Walkley, C. R. Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone* **62**, 56–63 (2014).
234. Mortus, J. R., Zhang, Y. & Hughes, D. P. M. Developmental pathways hijacked by osteosarcoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **804**, 93–118 (2014).
235. Crose, L. E. S. *et al.* Alveolar rhabdomyosarcoma-associated PAX3-FOXO1 promotes tumorigenesis via Hippo pathway suppression. *J. Clin. Invest.* **124**, 285–296 (2014).
236. Tremblay, A. M. *et al.* The Hippo transducer YAP1 transforms activated satellite cells and is a potent effector of embryonal rhabdomyosarcoma formation. *Cancer Cell* **26**, 273–287 (2014).
237. Loeb, D. M., Thornton, K. & Shokek, O. Pediatric soft tissue sarcomas. *Surg. Clin. North Am.* **88**, 615–627, vii (2008).
238. Jiang, Y., Ludwig, J. & Janku, F. Targeted therapies for advanced Ewing sarcoma family of tumors. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 391–400 (2015).
239. Douglas, D. *et al.* BMI-1 promotes ewing sarcoma tumorigenicity independent of CDKN2A repression. *Cancer Res.* **68**, 6507–6515 (2008).
240. Hsu, J. H. & Lawlor, E. R. BMI-1 suppresses contact inhibition and stabilizes YAP in Ewing sarcoma. *Oncogene* **30**, 2077–2085 (2011).
241. Deel, M. D., Li, J. J., Crose, L. E. S. & Linardic, C. M. A Review: Molecular Aberrations within Hippo Signaling in Bone and Soft-Tissue Sarcomas. *Front. Oncol.* **5**, 190 (2015).
242. Basu-Roy, U. *et al.* Sox2 antagonizes the Hippo pathway to maintain stemness in cancer cells. *Nat. Commun.* **6**, 6411 (2015).
243. Chan, L. H. *et al.* Hedgehog signaling induces osteosarcoma development through Yap1 and H19 overexpression. *Oncogene* **33**, 4857–4866 (2014).

244. Elisi, G. M. *et al.* Repurposing of Drugs Targeting YAP-TEAD Functions. *Cancers* **10**, (2018).
245. Liu-Chittenden, Y. *et al.* Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev.* **26**, 1300–1305 (2012).
246. Chen, X. *et al.* C-MYC and BCL-2 mediate YAP-regulated tumorigenesis in OSCC. *Oncotarget* **9**, 668–679 (2017).
247. Sanna, L. *et al.* Verteporfin exhibits anti-proliferative activity in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma cell lines. *Chem. Biol. Interact.* **312**, 108813 (2019).
248. Brodowska, K. *et al.* The clinically used photosensitizer Verteporfin (VP) inhibits YAP-TEAD and human retinoblastoma cell growth in vitro without light activation. *Exp. Eye Res.* **124**, 67–73 (2014).
249. Shi, G., Wang, H., Han, H., Gan, J. & Wang, H. Verteporfin enhances the sensitivity of LOVO/TAX cells to taxol via YAP inhibition. *Exp. Ther. Med.* **16**, 2751–2755 (2018).
250. Al-Moujahed, A. *et al.* Verteporfin inhibits growth of human glioma in vitro without light activation. *Sci. Rep.* **7**, 7602 (2017).
251. Dasari, V. R. *et al.* Verteporfin exhibits YAP-independent anti-proliferative and cytotoxic effects in endometrial cancer cells. *Oncotarget* **8**, 28628–28640 (2017).
252. Zhang, H. *et al.* Tumor-selective proteotoxicity of verteporfin inhibits colon cancer progression independently of YAP1. *Sci. Signal.* **8**, ra98 (2015).
253. Wang, C. *et al.* Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 27–37 (2016).
254. Sun, J. *et al.* A tightly controlled Src-YAP signaling axis determines therapeutic response to dasatinib in renal cell carcinoma. *Theranostics* **8**, 3256–3267 (2018).

255. Taccioli, C. *et al.* MDP, a database linking drug response data to genomic information, identifies dasatinib and statins as a combinatorial strategy to inhibit YAP/TAZ in cancer cells. *Oncotarget* **6**, 38854–38865 (2015).
256. Zhao, W., Liu, H., Wang, J., Wang, M. & Shao, R. Cyclizing-berberine A35 induces G2/M arrest and apoptosis by activating YAP phosphorylation (Ser127). *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **37**, 98 (2018).
257. Zanconato, F. *et al.* Transcriptional addiction in cancer cells is mediated by YAP/TAZ through BRD4. *Nat. Med.* **24**, 1599–1610 (2018).
258. Bouvier, C. *et al.* Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β 1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget* **7**, 64702–64710 (2016).
259. Geller, D. S. & Gorlick, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* **8**, 705–718 (2010).
260. Simpson, E. & Brown, H. L. Understanding osteosarcomas. *JAAPA Off. J. Am. Acad. Physician Assist.* **31**, 15–19 (2018).
261. Zamborsky, R., Kokavec, M., Harsanyi, S. & Danisovic, L. Identification of Prognostic and Predictive Osteosarcoma Biomarkers. *Med. Sci. Basel Switz.* **7**, (2019).
262. Broadhead, M. L., Clark, J. C. M., Myers, D. E., Dass, C. R. & Choong, P. F. M. The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review. *Sarcoma* **2011**, 959248 (2011).
263. Yarber, J. L. & Agulnik, M. Targeted therapies in bone sarcomas: current approach and future directions. *Expert Opin. Investig. Drugs* **20**, 973–979 (2011).
264. Zhang, Y. *et al.* Progress in the chemotherapeutic treatment of osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **16**, 6228–6237 (2018).

265. Piperno-Neumann, S. *et al.* Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 1070–1080 (2016).
266. Dean, D. C., Shen, S., Hornicek, F. J. & Duan, Z. From genomics to metabolomics: emerging metastatic biomarkers in osteosarcoma. *Cancer Metastasis Rev.* **37**, 719–731 (2018).
267. Misra, J. R. & Irvine, K. D. The Hippo Signaling Network and Its Biological Functions. *Annu. Rev. Genet.* **52**, 65–87 (2018).
268. Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* **19**, 491–505 (2010).
269. Han, Y. Analysis of the role of the Hippo pathway in cancer. *J. Transl. Med.* **17**, 116 (2019).
270. Moon, S. *et al.* Phosphorylation by NLK inhibits YAP-14-3-3-interactions and induces its nuclear localization. *EMBO Rep.* **18**, 61–71 (2017).
271. Piccolo, S., Dupont, S. & Cordenonsi, M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* **94**, 1287–1312 (2014).
272. Zanconato, F. *et al.* Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1218–1227 (2015).
273. Gregorieff, A. & Wrana, J. L. Hippo signalling in intestinal regeneration and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **48**, 17–25 (2017).
274. Moroishi, T. *et al.* A YAP/TAZ-induced feedback mechanism regulates Hippo pathway homeostasis. *Genes Dev.* **29**, 1271–1284 (2015).
275. Sanchez-Vega, F. *et al.* Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell* **173**, 321-337.e10 (2018).

276. Zanconato, F., Cordenonsi, M. & Piccolo, S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* **29**, 783–803 (2016).
277. Zhang, Y.-H., Li, B., Shen, L., Shen, Y. & Chen, X.-D. The role and clinical significance of YES-associated protein 1 in human osteosarcoma. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **26**, 157–167 (2013).
278. Bouvier, C. *et al.* Prognostic value of the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ and β 1-integrin in conventional osteosarcoma. *Oncotarget* **7**, 64702–64710 (2016).
279. Basu-Roy, U. *et al.* PPAR γ agonists promote differentiation of cancer stem cells by restraining YAP transcriptional activity. *Oncotarget* **7**, 60954–60970 (2016).
280. Chai, J., Xu, S. & Guo, F. TEAD1 mediates the oncogenic activities of Hippo-YAP1 signaling in osteosarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **488**, 297–302 (2017).
281. Ho, X. D. *et al.* Whole transcriptome analysis identifies differentially regulated networks between osteosarcoma and normal bone samples. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **242**, 1802–1811 (2017).
282. Piersma, B., Bank, R. A. & Boersema, M. Signaling in Fibrosis: TGF- β , WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front. Med.* **2**, 59 (2015).
283. Kansara, M., Teng, M. W., Smyth, M. J. & Thomas, D. M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 722–735 (2014).
284. Kager, L., Tamamyran, G. & Bielack, S. Novel insights and therapeutic interventions for pediatric osteosarcoma. *Future Oncol. Lond. Engl.* **13**, 357–368 (2017).
285. Isakoff, M. S., Bielack, S. S., Meltzer, P. & Gorlick, R. Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 3029–3035 (2015).

286. Duchman, K. R., Gao, Y. & Miller, B. J. Prognostic factors for survival in patients with high-grade osteosarcoma using the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program database. *Cancer Epidemiol.* **39**, 593–599 (2015).
287. Marko, T. A., Diessner, B. J. & Spector, L. G. Prevalence of Metastasis at Diagnosis of Osteosarcoma: An International Comparison. *Pediatr. Blood Cancer* **63**, 1006–1011 (2016).
288. Zanconato, F., Battilana, G., Cordenonsi, M. & Piccolo, S. YAP/TAZ as therapeutic targets in cancer. *Curr. Opin. Pharmacol.* **29**, 26–33 (2016).
289. Wang, Y. *et al.* Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer. *Cell Rep.* **25**, 1304-1317.e5 (2018).
290. Kumar, R. M. R. & Fuchs, B. Hedgehog signaling inhibitors as anti-cancer agents in osteosarcoma. *Cancers* **7**, 784–794 (2015).
291. Jie, X.-X., Zhang, X.-Y. & Xu, C.-J. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget* **8**, 81558–81571 (2017).
292. Kim, C.-L., Choi, S.-H. & Mo, J.-S. Role of the Hippo Pathway in Fibrosis and Cancer. *Cells* **8**, (2019).
293. Danieau, G., Morice, S., Rédini, F., Verrecchia, F. & Royer, B. B.-L. New Insights about the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies? *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
294. Zhou, J., Liu, T. & Wang, W. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 9 expression in osteosarcoma: A meta-analysis of 16 studies. *Medicine (Baltimore)* **97**, e13051 (2018).

295. Morikawa, Y. *et al.* Actin cytoskeletal remodeling with protrusion formation is essential for heart regeneration in Hippo-deficient mice. *Sci. Signal.* **8**, ra41 (2015).
296. Luo, J. & Yu, F.-X. GPCR-Hippo Signaling in Cancer. *Cells* **8**, (2019).
297. Nardone, G. *et al.* YAP regulates cell mechanics by controlling focal adhesion assembly. *Nat. Commun.* **8**, 15321 (2017).
298. Qiao, Y. *et al.* YAP Regulates Actin Dynamics through ARHGAP29 and Promotes Metastasis. *Cell Rep.* **19**, 1495–1502 (2017).
299. Shen, J. *et al.* Hippo component YAP promotes focal adhesion and tumour aggressiveness via transcriptionally activating THBS1/FAK signalling in breast cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **37**, 175 (2018).
300. Varelas, X. *et al.* TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **10**, 837–848 (2008).
301. Fujii, M. *et al.* Convergent signaling in the regulation of connective tissue growth factor in malignant mesothelioma: TGF β signaling and defects in the Hippo signaling cascade. *Cell Cycle Georget. Tex* **11**, 3373–3379 (2012).
302. Grannas, K. *et al.* Crosstalk between Hippo and TGF β : Subcellular Localization of YAP/TAZ/Smad Complexes. *J. Mol. Biol.* **427**, 3407–3415 (2015).
303. Kim, D.-H. *et al.* Src-mediated crosstalk between FXR and YAP protects against renal fibrosis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* fj201900325R (2019) doi:10.1096/fj.201900325R.
304. Liu, F. *et al.* Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **308**, L344-357 (2015).
305. Marie, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **473**, 98–105 (2008).

306. Azzolin, L. *et al.* Role of TAZ as mediator of Wnt signaling. *Cell* **151**, 1443–1456 (2012).
307. Liu-Chittenden, Y. *et al.* Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes Dev.* **26**, 1300–1305 (2012).
308. Geller, D. S. & Gorlick, R. Osteosarcoma: a review of diagnosis, management, and treatment strategies. *Clin. Adv. Hematol. Oncol. HO* **8**, 705–718 (2010).
309. Ottaviani, G. & Jaffe, N. The epidemiology of osteosarcoma. *Cancer Treat. Res.* **152**, 3–13 (2009).
310. Mirabello, L., Troisi, R. J. & Savage, S. A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int. J. Cancer* **125**, 229–234 (2009).
311. Marti, P. *et al.* YAP promotes proliferation, chemoresistance, and angiogenesis in human cholangiocarcinoma through TEAD transcription factors. *Hepatology* **62**, 1497–1510 (2015).
312. Ren, Y. R. *et al.* Unbiased discovery of interactions at a control locus driving expression of the cancer-specific therapeutic and diagnostic target, mesothelin. *J. Proteome Res.* **11**, 5301–5310 (2012).
313. Liu, Y. *et al.* Increased TEAD4 expression and nuclear localization in colorectal cancer promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a YAP-independent manner. *Oncogene* **35**, 2789–2800 (2016).
314. Knight, J. F. *et al.* TEAD1 and c-Cbl are novel prostate basal cell markers that correlate with poor clinical outcome in prostate cancer. *Br. J. Cancer* **99**, 1849–1858 (2008).
315. Lim, B. *et al.* Integrative genomics analysis reveals the multilevel dysregulation and oncogenic characteristics of TEAD4 in gastric cancer. *Carcinogenesis* **35**, 1020–1027 (2014).

316. Murakami, S. *et al.* A Yap-Myc-Sox2-p53 Regulatory Network Dictates Metabolic Homeostasis and Differentiation in Kras-Driven Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Dev. Cell* **51**, 113-128.e9 (2019).
317. Kulik, G. ADRB2-Targeting Therapies for Prostate Cancer. *Cancers* **11**, (2019).
318. Zhang, D., Ma, Q. Y., Hu, H.-T. & Zhang, M. β 2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NF- κ B and AP-1. *Cancer Biol. Ther.* **10**, 19–29 (2010).
319. Renz, B. W. *et al.* β 2 Adrenergic-Neurotrophin Feedforward Loop Promotes Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* **33**, 75-90.e7 (2018).
320. Wang, C. *et al.* Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 27–37 (2016).
321. Lamar, J. M. *et al.* The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, E2441–E2450 (2012).
322. Wang, T. *et al.* YAP promotes breast cancer metastasis by repressing growth differentiation factor-15. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1864**, 1744–1753 (2018).
323. Horie, M., Saito, A., Ohshima, M., Suzuki, H. I. & Nagase, T. YAP and TAZ modulate cell phenotype in a subset of small cell lung cancer. *Cancer Sci.* **107**, 1755–1766 (2016).
324. Yuan, Y. *et al.* YAP overexpression promotes the epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Mol. Med. Rep.* **13**, 237–242 (2016).
325. Rice, A. J. *et al.* Matrix stiffness induces epithelial-mesenchymal transition and promotes chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* **6**, e352 (2017).
326. Damsky, W. E. *et al.* β -catenin signaling controls metastasis in Braf-activated Pten-deficient melanomas. *Cancer Cell* **20**, 741–754 (2011).

327. Zhang, D. *et al.* The role of β -catenin in the initiation and metastasis of TA2 mice spontaneous breast cancer. *J. Cancer* **8**, 2114–2123 (2017).
328. Qi, J. *et al.* New Wnt/ β -catenin target genes promote experimental metastasis and migration of colorectal cancer cells through different signals. *Gut* **65**, 1690–1701 (2016).
329. Huo, W. *et al.* MicroRNA-527 inhibits TGF- β /SMAD induced epithelial-mesenchymal transition via downregulating SULF2 expression in non-small-cell lung cancer. *Math. Biosci. Eng. MBE* **16**, 4607–4621 (2019).
330. Li, W.-Q., Zhang, J.-P., Wang, Y.-Y., Li, X.-Z. & Sun, L. MicroRNA-422a functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer through SULF2-mediated TGF- β /SMAD signaling pathway. *Cell Cycle Georget. Tex* **18**, 1727–1744 (2019).
331. Yi, J. *et al.* MiR-HCC2 Up-regulates BAMBI and ELMO1 Expression to Facilitate the Proliferation and EMT of Hepatocellular Carcinoma Cells. *J. Cancer* **10**, 3407–3419 (2019).
332. Chin, L., Xia, Y., Discher, D. E. & Janmey, P. A. Mechanotransduction in cancer. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **11**, 77–84 (2016).
333. Seo, J. & Kim, J. Regulation of Hippo signaling by actin remodeling. *BMB Rep.* **51**, 151–156 (2018).
334. Dasgupta, I. & McCollum, D. Control of cellular responses to mechanical cues through YAP/TAZ regulation. *J. Biol. Chem.* (2019) doi:10.1074/jbc.REV119.007963.
335. Ohgushi, M., Minaguchi, M. & Sasai, Y. Rho-Signaling-Directed YAP/TAZ Activity Underlies the Long-Term Survival and Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **17**, 448–461 (2015).
336. Driscoll, T. P., Cosgrove, B. D., Heo, S.-J., Shurden, Z. E. & Mauck, R. L. Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophys. J.* **108**, 2783–2793 (2015).

337. Paolillo, M. & Schinelli, S. Extracellular Matrix Alterations in Metastatic Processes. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
338. Pickup, M. W., Mouw, J. K. & Weaver, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* **15**, 1243–1253 (2014).
339. Chang, C. *et al.* A laminin 511 matrix is regulated by TAZ and functions as the ligand for the $\alpha 6\beta 1$ integrin to sustain breast cancer stem cells. *Genes Dev.* **29**, 1–6 (2015).
340. Li, T., Kang, G., Wang, T. & Huang, H. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic gene therapy for cancer. *Oncol. Lett.* **16**, 687–702 (2018).
341. Strieter, R. M., Burdick, M. D., Gomperts, B. N., Belperio, J. A. & Keane, M. P. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 593–609 (2005).
342. Wang, Y. *et al.* Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell-Secreted CXCL1 and CXCL8 Facilitate Breast Tumor Growth By Promoting Angiogenesis. *Stem Cells Dayt. Ohio* **35**, 2060–2070 (2017).
343. Miyake, M., Goodison, S., Urquidi, V., Gomes Giacoia, E. & Rosser, C. J. Expression of CXCL1 in human endothelial cells induces angiogenesis through the CXCR2 receptor and the ERK1/2 and EGF pathways. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **93**, 768–778 (2013).
344. Liu, Q. *et al.* The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* **31**, 61–71 (2016).
345. Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G. & Kyrodimos, E. The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clin. Exp. Metastasis* **35**, 309–318 (2018).
346. Dawood, S., Austin, L. & Cristofanilli, M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy. *Oncol. Williston Park N* **28**, 1101–1107, 1110 (2014).

347. Szakács, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C. & Gottesman, M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 219–234 (2006).
348. Zhou, W. *et al.* Advances in targeted therapy for osteosarcoma. *Discov. Med.* **17**, 301–307 (2014).
349. Choi, Y. H. & Yu, A.-M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr. Pharm. Des.* **20**, 793–807 (2014).
350. Cui, H., Zhang, A. J., Chen, M. & Liu, J. J. ABC Transporter Inhibitors in Reversing Multidrug Resistance to Chemotherapy. *Curr. Drug Targets* **16**, 1356–1371 (2015).
351. Liu, T. *et al.* Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget* **7**, 83502–83513 (2016).
352. Robey, R. W. *et al.* Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat. Rev. Cancer* **18**, 452–464 (2018).
353. Chen, M. *et al.* miR-590-5p suppresses hepatocellular carcinoma chemoresistance by targeting YAP1 expression. *EBioMedicine* **35**, 142–154 (2018).
354. Mohamed, Z. *et al.* miR-363 confers taxane resistance in ovarian cancer by targeting the Hippo pathway member, LATS2. *Oncotarget* **9**, 30053–30065 (2018).
355. Yeung, B., Khanal, P., Mehta, V., Trinkle-Mulcahy, L. & Yang, X. Identification of Cdk1-LATS-Pin1 as a Novel Signaling Axis in Anti-tubulin Drug Response of Cancer Cells. *Mol. Cancer Res. MCR* **16**, 1035–1045 (2018).
356. Nguyen, C. D. K. & Yi, C. YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Trends Cancer* **5**, 283–296 (2019).
357. Zhao, X. *et al.* A combinatorial strategy using YAP and pan-RAF inhibitors for treating KRAS-mutant pancreatic cancer. *Cancer Lett.* **402**, 61–70 (2017).
358. Fruman, D. A. *et al.* The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* **170**, 605–635 (2017).

359. Guerrero-Zotano, A., Mayer, I. A. & Arteaga, C. L. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 515–524 (2016).
360. Massacesi, C. *et al.* PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. *OncoTargets Ther.* **9**, 203–210 (2016).
361. Metronomic Chemotherapy in Patients With Advanced Solid Tumor With Bone Metastasis and Advanced Pretreated Osteosarcoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02517918>.
362. Vo, K. T. *et al.* Phase 1 study of sirolimus in combination with oral cyclophosphamide and topotecan in children and young adults with relapsed and refractory solid tumors. *Oncotarget* **8**, 23851–23861 (2016).
363. Study of AP23573/MK-8669 (Ridaforolimus), A Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibitor, in Participants With Advanced Sarcoma (MK-8669-018 AM1)(COMPLETED) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00093080>.
364. Du, B. & Shim, J. S. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Mol. Basel Switz.* **21**, (2016).
365. Prieto-Vila, M., Takahashi, R., Usuba, W., Kohama, I. & Ochiya, T. Drug Resistance Driven by Cancer Stem Cells and Their Niche. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
366. Shibue, T. & Weinberg, R. A. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 611–629 (2017).
367. Mitra, A., Mishra, L. & Li, S. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget* **6**, 10697–10711 (2015).
368. Asano, Y. *et al.* Pak3 inhibits local actin filament formation to regulate global cell polarity. *HFSP J.* **3**, 194–203 (2009).

369. Baek, S. H. *et al.* Requirement for Pak3 in Rac1-induced organization of actin and myosin during *Drosophila* larval wound healing. *FEBS Lett.* **586**, 772–777 (2012).
370. Le, S. *et al.* Mechanotransmission and Mechanosensing of Human alpha-Actinin 1. *Cell Rep.* **21**, 2714–2723 (2017).
371. Takada, Y., Ye, X. & Simon, S. The integrins. *Genome Biol.* **8**, 215 (2007).
372. Song, S. *et al.* A Novel YAP1 Inhibitor Targets CSC-Enriched Radiation-Resistant Cells and Exerts Strong Antitumor Activity in Esophageal Adenocarcinoma. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 443–454 (2018).
373. Chou, T.-C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res.* **70**, 440–446 (2010).

ARTICLES SCIENTIFIQUES



Review

New Insights about the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Primary Bone Tumors and Their Microenvironment: A Promising Target to Develop Therapeutic Strategies?

Geoffroy Danieau, Sarah Morice, Françoise Rédini, Franck Verrecchia and
Bénédicte Brounais-Le Royer *

Université de Nantes, INSERM, UMR1238, Phy-OS, Sarcomes Osseux et Remodelage des Tissus Calcifiés,
44035 Nantes, France

* Correspondence: benedicte.brounais@univ-nantes.fr; Tel.: +33-0240412846

Received: 17 July 2019; Accepted: 31 July 2019; Published: 31 July 2019



Abstract: Osteosarcoma and Ewing sarcoma are the most common malignant primary bone tumors mainly occurring in children, adolescents and young adults. Current standard therapy includes multidrug chemotherapy and/or radiation specifically for Ewing sarcoma, associated with tumor resection. However, patient survival has not evolved for the past decade and remains closely related to the response of tumor cells to chemotherapy, reaching around 75% at 5 years for patients with localized forms of osteosarcoma or Ewing sarcoma but less than 30% in metastatic diseases and patients resistant to initial chemotherapy. Despite Ewing sarcoma being characterized by specific *EWSR1-ETS* gene fusions resulting in oncogenic transcription factors, currently, no targeted therapy could be implemented. It seems even more difficult to develop a targeted therapeutic strategy in osteosarcoma which is characterized by high complexity and heterogeneity in genomic alterations. Nevertheless, the common point between these different bone tumors is their ability to deregulate bone homeostasis and remodeling and divert them to their benefit. Therefore, targeting different actors of the bone tumor microenvironment has been hypothesized to develop new therapeutic strategies. In this context, it is well known that the Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a key role in cancer development, including osteosarcoma and Ewing sarcoma as well as in bone remodeling. Moreover, recent studies highlight the implication of the Wnt/ β -catenin pathway in angiogenesis and immuno-surveillance, two key mechanisms involved in metastatic dissemination. This review focuses on the role played by this signaling pathway in the development of primary bone tumors and the modulation of their specific microenvironment.

Keywords: Wnt/ β -catenin; bone sarcoma; bone tumor microenvironment

1. Primary Bone Tumors: Osteosarcoma and Ewing Sarcoma

Osteosarcoma and Ewing sarcoma are the most common primary bone tumors mainly occurring in children, adolescents and young adults. Current standard therapy includes multidrug chemotherapy and/or radiation for Ewing sarcoma, associated with tumor resection. However, the 5-year survival rates have not been improved during the last decades reaching 70–80% for patients with localized forms, but less than 30% in metastatic diseases and patients resistant to initial chemotherapy [1–5].

Osteosarcoma that mainly occurs at the ends of long bones is not associated with any clinical signs except severe pain or spontaneous fracture. Osteosarcoma does not express specific oncogenic markers but exhibits a large number and variety of genetic alterations. Ewing sarcoma is a tumor composed of small undifferentiated round cells that can appear mainly in bones but also in soft tissues in 15% of

cases. In contrast to osteosarcoma, Ewing sarcoma is characterized by a chromosomal translocation between the *EWSR1* and *FLI1* genes in 90% of cases, or by the fusion of *EWSR1* with other transcription factors of the E26 Transformation-Specific (ETS) gene family in 10% of cases [6–8].

Despite progress in understanding the biology of osteosarcoma and Ewing sarcoma, no targeted therapy could be currently implemented to improve patient survival. Nevertheless, the common point between these two pediatric bone tumors is their ability to deregulate bone homeostasis and remodeling to divert them to their benefit. Therefore, new therapeutic research is moving towards targeting different actors of the bone microenvironment.

2. Tumor Microenvironment: Crucial Role in Bone Sarcoma Tumor Growth and Metastatic Progression

It is well established that the bone tumor microenvironment (TME) plays a major role during tumor initiation, progression, and metastatic processes. This very complex and dynamic environment includes different cell types such as osteoblasts, osteoclasts, stromal cells, mesenchymal stem cells, immune or endothelial cells and non-cellular components such as the extracellular matrix compounds [9]. These cells are able to communicate with each other in order to influence their behavior [10]. This microenvironment is able to support bone sarcoma primary development, resistance to chemotherapy [11] and metastatic spread of tumor cells [12–14].

The crucial role played by the TME on sarcoma development has been recently highlighted in several studies. As an example, a modification of the transcriptome has been observed in cell lines established from synovial sarcomas compared to initial tumors or directly engrafted tumors in mice, demonstrating the impact of TME on tumor behavior, particularly through interactions with the immune system and stromal cells [15]. The bone TME is also able to affect the behavior and the fate of tumor cells and particularly, their ability to migrate and invade new tissues. Indeed, the development of sarcoma in orthotopic models of xenograft was associated with the establishment of metastases whereas the subcutaneous model did not allow to observe any metastatic spread [16]. These enhanced invasive and migratory capacities have been confirmed in a rat model of prostate carcinoma and related to the acidification of the bone tumor microenvironment [17]. Similarly, Chattopadhyay et al. have observed that solid sarcoma developed differentially when implanted into two different anatomical sites, related to a greater neovascularization and the presence of tumor-associated fibroblasts and tumor-associated adipocytes, which could support sarcoma tumor growth [18].

2.1. Hijacking of the Bone Tumor Microenvironment by Bone Sarcoma Cells

One of the main hallmarks of osteosarcoma and Ewing sarcoma is their ability to disrupt bone remodeling in favor of an exacerbated osteoclast-mediated bone resorption, leading to the release of pro-tumoral factors initially embedded in the bone matrix [19–21]. It thus establishes a vicious cycle between bone sarcoma proliferation and bone resorption, leading to investigations about the beneficial effect of anti-resorptive agents on bone sarcoma progression. Thus zoledronate, an N-containing bisphosphonate able to inhibit osteoclasts proliferation and activity, reduces osteosarcoma and Ewing sarcoma primary and metastatic development in corresponding pre-clinical models, disrupting the vicious cycle between tumor growth and osteoclast-mediated bone resorption [22–25].

Human Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) play also a major role in the communication between tumor cells and their microenvironment, as highlighted by recent studies, including increased proliferation and migration of tumor cells. On one hand, bone marrow MSCs promote migration and invasion through direct secretion of several cytokines such as C-X-C motif chemokine ligand 12 (CXCL12) that binds to C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4) or CXCR7 on osteosarcoma associated with lower overall patient survival [26–28]. Interleukin-6, secreted by MSCs, contributes to promote metastatic dissemination of osteosarcoma [29,30]. On the other hand, MSCs release exosomes that promote tumor growth and metastases [31]. Other types of stem cells such as the stromal adipose-derived mesenchymal stem cells stimulate tumor growth and invasion of osteosarcoma cells,

by activating the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathway, resulting in an increase of the expression of matrix metalloproteinase (MMP) 2 and MMP9 [32].

Bone sarcoma is able to modulate the recruitment, expansion and differentiation of immune cells to establish an immunosuppressive microenvironment, allowing tumor development and metastatic dissemination [33]. Regarding innate immunity, bone sarcomas are mainly invaded by TAMs that are initially divided into two categories: anti-tumor M1-polarized macrophages and tumor-promoting M2-polarized macrophages [34]. Macrophages massively invade osteosarcoma, this infiltration being associated with a good prognosis in osteosarcoma patients [35,36]. However, the implication of tumor-promoting M2-polarized macrophages infiltrates in osteosarcoma progression remains controversial. Indeed, M2-type macrophage infiltrates in the tumor have been correlated with a poor prognosis in some studies [36,37]. Moreover, on one hand, an imbalance in favor of M1 macrophages has been observed in patients without metastases [37]. On the other hand, M2-polarized macrophages have been associated with increased tumor growth and metastases in preclinical models of osteosarcoma [38]. However, a recent study based on the most important cohort of osteosarcoma patients from the OS2006 clinical trial has demonstrated that the presence of CD163⁺ M2-polarized macrophages is crucial for the inhibition of osteosarcoma progression [35]. In contrast, macrophages do not seem to play such a role in Ewing sarcoma development and patient survival [39,40]. Moreover, M2-polarized macrophages contribute to the exhaustion of T lymphocytes infiltrating the tumor, reducing their proliferation and secretion of pro-inflammatory cytokines [41]. These results may be associated with the existing metabolic competition between sarcoma cells and infiltrating T lymphocytes. Indeed, excessive consumption of glucose from the microenvironment by tumor cells restricts the consumption of T cells, which show decreased glycolysis and under-production of interferon γ (IFN γ). T cells respond less to stimuli, allowing the tumor to escape from immune control. Thus, metabolic competition between tumor cells and T cells influences tumor progression [42].

Besides cellular components, the physical properties of the TME can influence the behavior of cancer cells. Indeed, mechanical (composition of the extracellular matrix) and chemical stress (hypoxia) increase the motility and capacity of sarcoma cells to metastasize, through increased expression of procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2 (PLOD2), a collagen cross-linker [43]. Hypoxic microenvironment also leads to increased interleukin-6 expression in osteosarcoma cells, which contributes to increased lung metastases [44]. Finally, Ewing sarcoma in response to Wnt3a stimulation can modify the acellular TME by increasing the secretion of proteins involved in the composition of the extracellular matrix [45].

2.2. Bone Sarcoma Microenvironment as a Prognostic Marker or Therapeutic Target

Several studies have highlighted the importance of analyzing TME in order to predict patient outcomes. For example, Volchenboum et al. have demonstrated the importance of studying stromal cells in contact with the Ewing sarcoma, to predict patients at high risk of relapse, thanks to a gene set enrichment analysis conducted on human Ewing sarcomas samples by the Children's Oncology Group (COG) [46]. A strong expression of C-C motif ligand (CCL) 12 produced by infiltrating immune cells is correlated with an increased ratio of CD8⁺/CD4⁺ infiltrating T lymphocytes, leading to a better response to chemotherapy and overall patient survival [47]. In osteosarcoma, tissue micro-arrays analyses showed that the immune infiltrate of primary tumors was enriched with anti-tumor M1-type macrophages for the localized forms (CD68⁺ iNOS⁺, inducible nitric oxide synthase), as compared to metastatic diseases [37]. In addition, metastatic tumors have a higher vascular density than localized tumors, supporting that greater angiogenesis may partly explain metastatic spread.

Osteoclasts and immune cells are the main potential therapeutic targets for osteosarcoma and Ewing sarcoma. Based on preclinical data, the clinical trial OS2006 (NCT00470223, available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00470223>) has been developed to evaluate the combination of zoledronate with current chemotherapy and surgery in osteosarcoma patients. Unfortunately, the results do not recommend the use of zoledronate as no improvement in event-free survival was

observed, zoledronate showing a trend to increase the risk of failure in osteosarcoma patients [48]. Several therapeutic approaches targeting infiltrating immune system are currently in clinical development. For example, some of osteosarcoma and Ewing sarcoma express programmed cell death ligand (PDL)-1 that binds to programmed cell death (PD)-1 on infiltrating T cells, inhibiting their cytotoxic activities and contributing to the local immunosuppression and consequently to the tumor progression [49]. Based on pre-clinical data demonstrating the beneficial effect of PD-1/PDL-1 blockade [50] and correlations between PDL-1 expression and clinical outcomes [51,52], clinical trials evaluating the effects of anti-PD1 antibodies are in progress in osteosarcoma and Ewing sarcoma (Pembrolizumab, NCT02301039 (available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02301039>) and Nivolumab, NCT02304458 (available online: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02304458>)).

3. The Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway

The Wnt signaling pathway is essential during development and is involved in many cellular processes, such as proliferation, migration, polarization and cellular differentiation. This signaling pathway is therefore finely regulated and mutations or deregulation of the Wnt signaling pathway are often associated with tumor development, chemoresistance, or relapse [53–55]. Three Wnt signaling pathways have been described so far: the canonical Wnt pathway or Wnt/ β -catenin pathway on which we will focus, and the non-canonical Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) and Wnt/ Ca^{2+} pathways which are not detailed in this review.

Wnt ligands are a family of 19 secreted glycoproteins, some of which can bind to one of the 10 receptors of the Frizzled family (Fzd), or to a co-receptor lipoprotein receptor-related protein (LRP)-5 or LRP-6, receptor tyrosine-kinase-like orphan receptor (ROR), related to tyrosine kinase (Ryk), to activate cell signaling. In the absence of Wnt ligands, the Wnt/ β -catenin pathway is inactive, β -catenin is sequestered by a protein complex for degradation. This complex is composed of scaffold proteins, dishevelled (Dvl), adenomatous polyposis coli (APC) and Axin1/2 and Wilms tumor gene on X chromosome (WTX) protein [56], and two kinases, casein kinase 1 alpha (CK1 α) and glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) which sequentially phosphorylate β -catenin on Serine 45 (CK1 α), and on serine 33 and 37 and threonine 41 (GSK3 β). Yes-Associated protein/transcriptional co-activator with a PDZ-binding domain (YAP/TAZ) proteins, part of the complex, then recruit beta-transducin-repeat-containing protein (β -TrCP) an ubiquitin ligase responsible for the ubiquitination of β -catenin [57–61]. β -Catenin is then degraded by the proteasome pathway, and therefore does not play its role as a co-transcription factor. In addition, the transcriptional proteins of the T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) family interact with the transcriptional repressors groucho/transducin-like enhancer of split (TLE), recruiting histone deacetylases (HDACs) responsible for repressing transcription [62] (Figure 1, left panel).

The binding of a Wnt ligand (i.e., Wnt1, Wnt3a) to an Fzd receptor and its co-receptor LRP5/6 activates the canonical Wnt pathway, inducing the recruitment of Dvl on Fzd receptor and its activation. CK1 α and GSK3 β kinases then phosphorylate the LRP5/6 co-receptor, allowing the recruitment of Axin on LRP5/6 and the inactivation of the β -catenin degradation complex which is trapped to the membrane. Neosynthesized β -catenin is no longer degraded and accumulates in the cytoplasm [63], before being translocated into the nucleus. It interacts with the transcription factors of the TCF/LEF family and with histones modifying co-activators p300 or cAMP-response element binding protein (CREB) binding protein (CBP), B cell CLL/lymphoma 9 (BCL-9), brahma-related gene 1 (BRG1), and pygopus [64,65]. These complexes activate the transcription of target genes such as *AXIN2*, *LEF1*, *cMYC*, *CCND1*, *BIRC5* (Figure 1, right panel).

Numerous molecules are implicated in the regulation of Wnt ligands and the canonical Wnt pathway activation. These include secreted extracellular inhibitors: dickkopf (DKK), secreted-Fzd-related proteins (SFRPs), Wnt inhibitory factor 1 (WIF1), sclerostin (SOST), cerberus, insulin-like growth factor binding protein 4 (IGFBP4). DKK and SOST proteins are competitive receptor and co-receptor antagonists that prevent signaling activation by Wnt ligands. The WIF1, SFRPs (domain Fzd-like C-terminal)

and cerberus proteins are able to bind to Wnt ligands preventing their interaction with receptors and co-receptors [65,66].

The canonical Wnt signaling pathway is involved in many cancers, notably in gastrointestinal cancers (colorectal carcinoma, hepatocellular carcinoma, gastric cancer, cholangiocarcinoma, pancreatic ductal adenocarcinoma), hematopoietic cancers (acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, acute lymphoblastic leukemia, chronic lymphoblastic leukemia, lymphoma, multiple myeloma), breast cancer, melanoma, and brain tumors such as glioblastoma [67,68]. Its involvement in the tumorigenesis of many cancerous diseases makes it an interesting target for cancer treatment. That is why recent reviews of the literature have described the latest advances in targeting this signaling pathway [55,69–73]. Some Wnt inhibitor molecules are in clinical trials, most of them in Phase I [74,75], although the ubiquitous nature of this signaling pathway and its involvement in various major physiological processes raise the question of the side effects of this strategy [76].

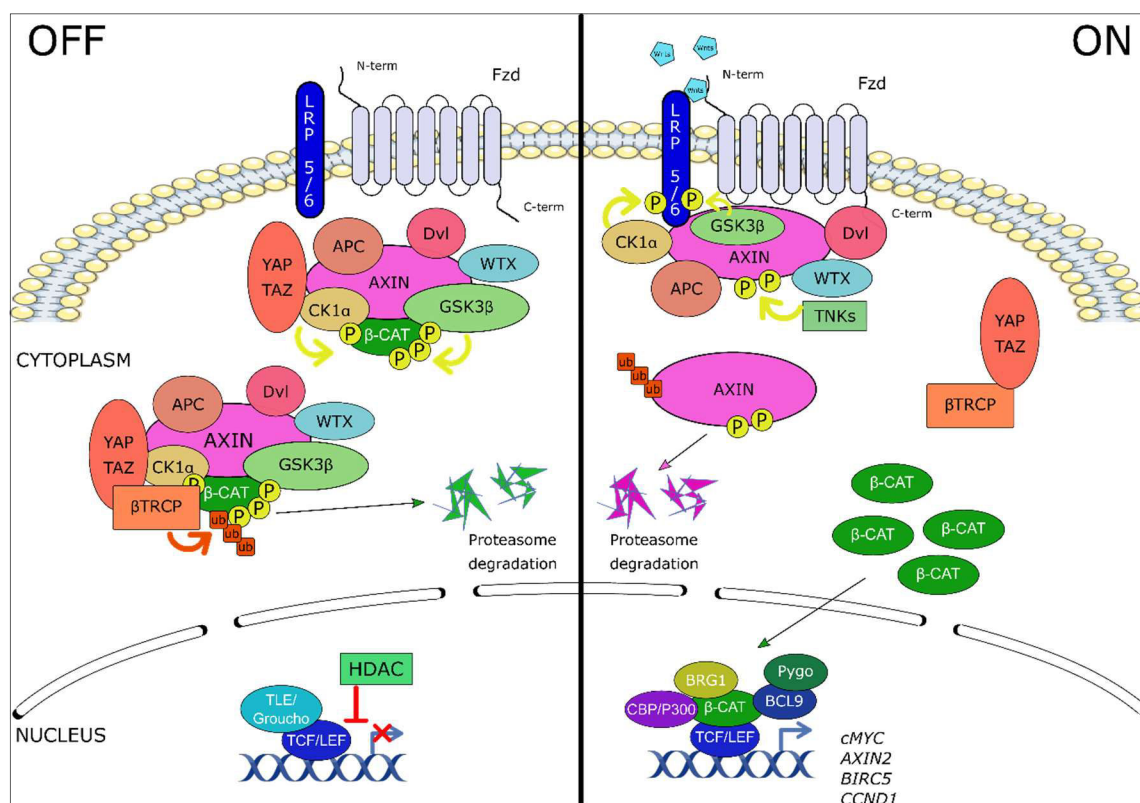


Figure 1. The canonical Wnt/β-catenin signaling pathway. Left panel: in the absence of Wnt ligand, β-catenin is sequestered by a protein complex composed of dishevelled (Dvl), adenomatous polyposis coli (APC), Axin1/2, Wilms tumor gene on X chromosome protein (WTX) and two kinases responsible for the phosphorylation of β-catenin, CK1α (casein kinase 1 alpha) and GSK3β (glycogen synthase kinase 3 beta). Then, YAP/TAZ (yes-associated protein/transcriptional co-Activator with a PDZ-binding domain) proteins recruit β-TrCP (beta-transducin-repeat-containing protein), a ubiquitin ligase responsible for the ubiquitination of β-catenin and its degradation by the proteasome pathway. In the nucleus, the transcriptional proteins of the TCF/LEF family (T-cell factor/lymphoid enhancer-binding factor) interact with the transcriptional repressors groucho/TLE (transducin-like enhancer of split), recruiting histone deacetylases (HDACs) responsible for repressing transcription. Right panel: Binding of the Wnt ligands to the frizzled (Fzd) receptor and low-density-lipoprotein-related protein 5/6 (LRP5/6) co-receptor complex induces the recruitment of the scaffold protein Dvl to Fzd and leads to LRP5/6 phosphorylation (P) by CK1α and GSK3β kinases. The β-catenin destruction complex is then trapped to the membrane through Axin/Fzd interaction, leading to its inactivation. In parallel, Axin proteins are degraded following poly-ADP-ribosylation by tankyrases (TNKS). Newly synthesized β-catenin

accumulates in the cytoplasm and translocates into the nucleus where it interacts with the transcription factors of the TCF/LEF family and with histones modifying co-activators p300 or CREB binding protein (CBP), B cell CLL/lymphoma 9 (BCL-9), brahma-related gene 1 (BRG1), and pygopus. These transcription complexes activate the transcription of target genes such as cMYC, AXIN2, BIRC5 or CCND1.

4. Key Role of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Osteosarcoma

The most recent researches on Wnt/ β -catenin implication in osteosarcoma deal with metastatic dissemination and recurrence that are associated with poor prognosis for patients. Thus, following a brief description of the implication of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in osteosarcoma development, this part will focus on these recent studies.

Canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway has been involved in the development of osteosarcoma but current knowledge remains unclear because of the high complexity of this pathway. Many studies support an aberrant activation of the canonical Wnt signaling pathway in osteosarcoma cells which seems to play a crucial role in tumorigenicity as well as metastatic dissemination [77,78]. As an example, two recent analyses on patient samples described a high β -catenin level in osteosarcoma tissues compared to adjacent healthy tissues associated with poor prognosis and lung metastatic dissemination [79,80] (Figure 2a). However, other studies highlighted that inactivation of the Wnt/ β -catenin pathway plays a key role in osteosarcoma development [81,82]. In particular, frequent deletions of genes involved in the Wnt signaling pathway genes have been described in osteosarcoma patients [83]. In this context, Shimozaki et al. showed that pharmacological inhibition or depletion of GSK3 β by siRNA decreases osteosarcoma cell proliferation despite an increased nuclear translocation of β -catenin and expression of its target genes supporting the tumor suppressor role of β -catenin [84]. However, to our knowledge, no additional recent study seems to support this second hypothesis.

A key issue of osteosarcoma metastasis is the epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like multi-step process, based on a transformation from an epithelial to a mesenchymal phenotype, promoting the invasive capacities of cancer cells. EMT is characterized by repression of key components of the intercellular junctions such as E-cadherin associated with an increase in mesenchymal markers including N-cadherin, vimentin and fibronectin. This modulation of gene expression is regulated by different transcription factors such as Snail-1, Snail-2, ZEB-1, ZEB-2 or Twist [85]. Despite the fact that osteosarcoma derives from cells of mesenchymal origin, an overexpression of EMT transcription factors such as Snails, ZEBs or Twist has been associated to increased invasive properties of osteosarcoma cells promoting the formation of metastases [86–89]. Transforming growth factor beta (TGF β) seems to be the main inducer of EMT in tumor cells [90], but cooperates with other signaling pathways including the Wnt/ β -catenin pathway to induce complete EMT [91]. Recent studies focusing on molecules implicated in EMT in osteosarcoma highlighted the implication of β -catenin in this biological process. Thus, Tian et al. have recently demonstrated that bone morphogenetic protein (BMP)-2 promotes EMT of osteosarcoma cells associated with enhanced motility and invasiveness through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [92]. Similarly, Fibulin-3, an extracellular glycoprotein, enhances EMT of osteosarcoma cells, associated with Wnt/ β -catenin pathway activation [93] (Figure 2a). Some other molecules implicated in osteosarcoma development and metastasis, such as ubiquitin-specific protease 7 and N-terminal truncated form of carboxypeptidase seem to exert their effects through induction of EMT in osteosarcoma cells by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [94,95]. These numerous recent studies demonstrate the interest to target Wnt/ β -catenin pathway in order to inhibit EMT in osteosarcoma cells.

EMT can also promote tumor cells to develop stem cell characteristics and consequently actively participate in the cancer stem cell (CSC) phenotype acquisition [96]. CSCs (also known as tumor-initiating cells or TIC) constitute a subpopulation of tumor cells with properties to self-renew and are responsible for tumor initiation and progression and, thanks to their chemotherapy resistance, seem to drive recurrences and metastases. CSCs are characterized by persistent activation of highly conserved signal transduction pathways including notch, hedgehog and Wnt pathways [97] and some evidence support the presence of CSCs in osteosarcoma and their contribution to metastatic

chemotherapy-resistant properties [98,99]. Martin-Neves et al. have described a constitutive activation of the Wnt/ β -catenin signaling in osteosarcoma CSCs rather than in parental osteosarcoma cells [100]. More recently, Liu et al., highlighted that β -catenin positively regulates osteosarcoma stem cells properties in vitro [79] (Figure 2a). These results support evidence that a therapy against the Wnt/ β -catenin pathway in osteosarcoma could allow to target CSCs and potentially improve treatment for metastatic and chemotherapy-resistant patients.

New insights about the role of long non-coding RNA (lncRNA) and micro RNA (miR) in osteosarcoma progression have also recently emerged. On one hand, the overexpression of a number of miR has been demonstrated in osteosarcoma cells leading to increased osteosarcoma growth and metastasis. Most of these miRs downregulate antagonists of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. As an example, miR-552-5p is overexpressed in osteosarcoma tissues and cell lines compared to healthy tissue and osteoblasts respectively. Knockdown of this miR decreases osteosarcoma proliferation and metastasis by directly inhibiting WIF1 [101]. On the other hand, some miRs that are able to restrain the expression of key intermediates or regulators of the Wnt/ β -catenin signaling pathway have been described to be downregulated, causing an aberrant activation of this pathway in osteosarcoma cells. Very recent studies described a decrease in miR-377, miR-873, miR-758 and miR-885-5p in osteosarcoma tissues and/or cell lines, leading to increased primary tumor and metastatic development in association with activated Wnt/ β -catenin signaling pathway [102–105]. Other studies deal with lncRNA such as lncRNA AWPPH which levels are increased in osteosarcoma tissues compared to healthy counterparts and promote tumor proliferation and metastasis through activation of the Wnt/ β -catenin pathway [106].

In addition to β -catenin, other modulators of the canonical Wnt signaling pathway, in particular, Wnt antagonists, are affected during osteosarcoma primary and metastatic development, but have already been described in several reviews and will not be developed here [107,108].

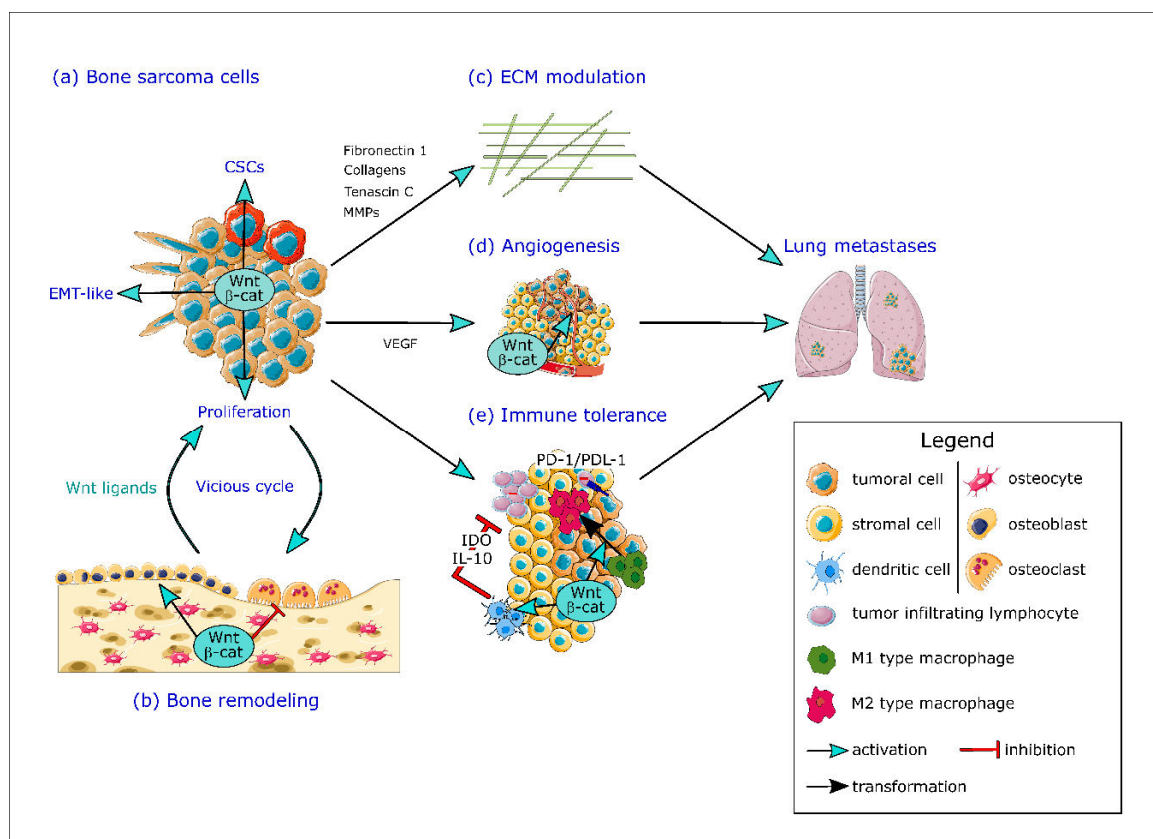


Figure 2. The crucial role of Wnt/ β -catenin signaling pathway in multiple steps of bone sarcoma progression and metastatic dissemination. (a) The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway is able to enhance bone sarcoma cells proliferation, to induce an epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like

through secretion of fibulin-3 and to promote the acquisition of stem cells properties of bone sarcoma cancer stem cells (CSCs). (b) The Wnt/ β -catenin pathway participates to the hijacking of the bone microenvironment by the bone sarcoma cells, leading to the establishment of a vicious cycle between bone remodeling and tumor cells proliferation associated with the release of pro-tumoral factors including Wnt ligands from the bone matrix. (c) The Wnt/ β -catenin pathway promotes the modulation of the extracellular matrix (ECM), increasing secretion of extracellular matrix components such as tenascin C, fibronectin 1 or collagens and stimulates the ECM degradation by upregulation of proteolytic enzymes such as MMPs. (d) The Wnt/ β -catenin pathway induces an over-expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), the most important pro-angiogenic factor and is also able to modulate endothelial cell migration, leading to an increase in tumor-associated angiogenesis. (e) The Wnt/ β -catenin signaling pathway participates to the establishment of an immune tolerance in the TME, enhancing pro-tumoral M2 macrophages polarization and inhibiting cytotoxic T cell infiltration and functions and inducing resistance to anti-PD1 or anti-PDL-1 therapy. The activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in dendritic cells leads to up-regulation of interleukin-10 (IL-10) and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO) secretion leading to an inhibition of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) cytotoxic properties. By targeting both osteosarcoma and Ewing sarcoma cells and the bone TME, the Wnt/ β -catenin signaling pathway participates to the disease progression and the establishment of lung metastases.

5. Involvement of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Ewing Sarcoma

The involvement of the Wnt signaling pathway in Ewing sarcoma is less described than in osteosarcoma and seems to be controversial. First, no recurrent mutations in the Wnt/ β -catenin signaling pathway have been reported in Ewing sarcoma but the activation of this pathway has been demonstrated in aggressive sarcoma, the bone microenvironment being the source of Wnt ligands. Moreover, this activation can be potentiated through the R-spondin (RSPO)/leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5)/ β -catenin axis. Indeed, LGR5 is highly expressed in aggressive Ewing sarcoma and CSCs and the binding of RSPO-2 on LGR5 was able to potentiate Wnt3a-induced canonical Wnt signaling. However, it seems that an important variability in Wnt responsiveness exists among Ewing sarcoma cells based on the differential expression of LGR5 and the availability of Wnt and RSPO ligands in the tumor microenvironment [109]. The proliferation of Ewing sarcoma cells is not affected by the Wnt/ β -catenin pathway activation [110]. However, this signaling pathway appears to play a crucial role in the cellular motility of Ewing sarcoma cells [111]. Thus, the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in Ewing sarcoma cells induces, on one hand, the formation of neurite outgrowth and, on the other hand, changes in transcriptional profile, leading to the acquisition of a more aggressive metastatic phenotype by tumor cells [109,112]. To go further, molecular mechanisms have been explored. Surprisingly, the activation of the Wnt/ β -catenin pathway partially antagonizes the transcriptional function of the fusion protein EWS/FLI1 (found in the majority of Ewing sarcomas), resulting in an up regulation of metastasis-promoting genes that are normally repressed by EWS/FLI1 and consequently, the acquisition of a more migratory phenotype. Inversely, some studies have shown that EWS/FLI1 inhibits β -catenin dependent transcription through a direct interaction between EWS/FLI1 and the transcription factor LEF1, inhibiting the interaction between β -catenin and LEF1 in Ewing sarcoma-cell lines [113]. To sum up, an inverse relationship between the expression of EWS/FLI1 and TCF/LEF target genes is observed in Ewing sarcoma cells [109,113].

The analysis of the secretome of Wnt3a-activated Ewing sarcoma cells has revealed an increased secretion of proteins implicated in the composition and the structure of the extracellular matrix. In details, Wnt3a-activated cells present an upregulation of the signaling pathways involved in the communication between the tumor and its microenvironment, such as integrin linked kinase, focal adhesion kinase, cadherin angiogenesis, TGF β and matrix metalloproteinase pathways [45].

Finally, the effects of WNT974, a Porcupine protein inhibitor involved in the palmitoylation of Wnt ligands, an indispensable process for Wnt secretion has been investigated in Ewing sarcoma. The WNT974-mediated inhibition of endogenous Wnt ligands secreted by tumor cells decreases the

migration of Ewing sarcoma cells in vitro, downregulating the expression of genes involved in cell migration. In addition, WNT974 appears to reduce the development of metastatic disease in vivo in a murine subcutaneous xenograft model and to delay the time of first lung metastasis establishment. WNT974 inhibits Wnt signaling pathways (canonical and non-canonical) and cell migration and dissemination, therefore demonstrated the role of the Wnt signaling pathway during Ewing sarcoma metastatic spread [114].

6. Wnt/ β -Catenin Pathway and the Bone Tumor Microenvironment

As described in the first part of the review, the bone TME is a complex and dynamic environment composed of both cellular and non-cellular components. This TME which includes bone, vascular and immune “niches” plays a key role in initiation, primary development and metastasis of osteosarcoma and Ewing sarcoma [115]. This part will focus on the implication of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in these three “niches” of the bone TME.

6.1. Wnt/ β -Catenin Pathway and Bone Remodeling

Bone remodeling results from a balance between osteoclasts-mediated bone resorption and osteoblasts-promoted bone formation. Osteocytes, trapped in the bone matrix, also contribute to the regulation of osteoblast and osteoclast functions during bone remodeling. In this context, the Wnt/ β -catenin signaling pathway is able to modulate both osteoblast and osteoclast differentiation and activity. Indeed, osteoblasts and their precursors, osteocytes and osteoclasts are able to secrete various Wnt ligands which participate in the control of bone remodeling [116–118]. Briefly, the Wnt/ β -catenin signaling pathway directly enhances osteoblast differentiation and bone formation whereas indirectly represses osteoclast differentiation and bone resorption through the production of osteoprotegerin by osteoblasts and osteocytes. Nevertheless, osteoclasts are also affected by Wnt ligands given that β -catenin activation enhances the proliferation of osteoclast precursors but inhibits osteoclastogenesis at a later stage [66,116,119].

The early-stage development of osteosarcoma and Ewing sarcoma initiates a dysregulation of the bone remodeling in favor of an exacerbated bone resorption, leading to the release of pro-tumorigenic factors initially trapped into the bone tissue (Figure 2b). Nevertheless, the implication of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in tumor cell-induced bone osteolysis has mainly been described in bone metastasis rather than in bone sarcoma. Interestingly, in breast cancer bone metastases, the Wnt/ β -catenin signaling pathway seems to be active inside the tumor with overexpression of canonical Wnt ligands (Wnt2 and Wnt8b), maintaining tumor cell proliferation. Conversely, Wnt2 and Wnt8b are downregulated at the tumor/bone interface while Wnt antagonists WIF1 and SFRP4 are overexpressed and could be responsible, at least in part, of suppression of osteoblast proliferation and enhanced bone destruction by osteoclasts [120]. Moreover, the DKK1 overexpression has been described in osteolytic breast cancer and could promote osteoclastogenesis and bone resorption at the site of metastasis [121]. To our knowledge, no studies compare the activation of the canonical Wnt signaling pathway between the bone sarcoma core and the bone/tumor interface.

An important step in the metastatic process of bone sarcoma is the degradation of the extracellular matrix related to upregulation of proteolytic enzymes such as MMPs. Several studies have highlighted that the invasive capacities of osteosarcoma cells are correlated with MMPs expression, particularly MMP-2 and MMP-9 [122]. Moreover, MMP-2 and/or MMP-9 expression can be associated with the development of metastasis, poor prognosis and resistance to chemotherapy in osteosarcoma patients [123–125]. It is also well established that MMP2 and MMP9 are expressed in Ewing sarcoma and closely associated with Ewing sarcoma invasion and metastasis [126,127]. β -catenin gene silencing by siRNA reduced invasion and motility of the U2OS human osteosarcoma cell line associated with inhibition of membrane type 1 metalloproteinase (MT1-MMP) expression. On one hand, MT1-MMP directly degrades extracellular matrix components such as type II collagen or fibronectin and, on the other hand, activates by cleavage other members of the MMP family such as MMP-2. Moreover,

a dominant-negative soluble LPR5 reduces the expression of MMP-2 and MMP-14, consistent with a decrease in invasive properties of the human SaOS2 osteosarcoma cell line [128]. Thus, these results suggest that β -catenin inhibition may decrease osteosarcoma invasion through downregulation of MMPs expression and activation [129–131]. In Ewing sarcoma, the implication of the Wnt/ β -catenin signaling pathway does not seem to be predominant for the expression and activation of MMPs. However, in Ewing sarcoma, Wnt/ β -catenin activation-induced expression of tenascin C, a secreted extracellular matrix protein that plays a key role during metastasis establishment in different types of cancer [132]. High level of tenascin C contributes to the Ewing sarcoma metastatic phenotype, modulating tumor microenvironment [109]. Activation of the canonical Wnt pathway also leads to increased secretion of the extracellular matrix components such as fibronectin or collagens, that alter the biochemical and structural properties of the bone TME and can modulate the metastatic process of Ewing sarcoma [45] (Figure 2c).

6.2. Wnt/ β -Catenin Pathway, Angiogenesis and Hypoxia

Angiogenesis is a complex biological process that leads to new blood vessel development and plays a key role in primary tumor progression and metastatic potential of several cancers including bone sarcoma. Stages of angiogenesis include the proliferation and migration of endothelial cells to form a vessel sprout and then the recruitment of pericytes or smooth muscle cells to produce a mature and functional blood vessel [133]. This process is necessary for tumor growth allowing the supply of nutrients and metastatic dissemination, providing an intravasation site for cancer cells [133,134]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most important pro-angiogenic factor involved in the formation of new functional vessels in tumors through recruitment and differentiation of endothelial progenitor cells [135].

Osteosarcoma patients with high VEGF expression levels exhibit both lower disease-free survival and lower overall survival [136]. Similarly, a genetic amplification of the *VEGFA* gene was detected in osteosarcoma and significantly associated with high microvessels density and low patient disease-free survival [137]. Several studies have also highlighted the importance of VEGF in angiogenesis of Ewing sarcoma. Indeed, high levels of VEGF have been detected in the serum of Ewing sarcoma patients and correlated with increased microvascular density and poor patient outcomes [135,138,139]. In particular, Ewing sarcoma cells produce several VEGF isoforms including soluble spliced isoform of VEGFA, VEGF-165, which promotes the recruitment of bone marrow derived cells. These cells can differentiate into both tumor-associated pericytes and endothelial cells, contributing to the new vasculature of Ewing sarcoma [140,141].

Regarding the role of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in angiogenesis, transcriptional regulation of VEGF by the β -catenin/TCF complex has been demonstrated, involving TCF binding sites in the *VEGF* gene promoter. Moreover, defects in APC, resulting in constitutively active β -catenin, induce the over-expression of VEGF [142,143]. Furthermore, the SFRPs proteins are a family of soluble Wnt inhibitors that act either through direct binding to Wnt proteins and preventing its interaction with Fzd receptors or through direct interaction with Fzd receptors [144]. First, endothelial cells seem to have a sequential response to SFRP-1 including an initial inhibition of angiogenesis by antagonizing the canonical Wnt signaling pathway followed by an activation of the non-canonical Wnt/PCP signaling pathway that promotes angiogenesis [145,146]. Second, a study has demonstrated that SFRP-4 induces a decrease in endothelial cell migration correlated with a reduction in tumor-associated angiogenesis in a mouse model of ovarian cancer [147]. All these studies highlighted the role of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in promoting angiogenesis (Figure 2d).

Only a few studies deal with the implication of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway in bone sarcoma-associated angiogenesis. Nevertheless, a study has described that naked cuticle homolog 2 (NKD2), a negative regulator of Wnt signaling, downregulates the expression of genes involved in the vasculature development of osteosarcoma [148], suggesting a pro-angiogenic role of

the Wnt/ β -catenin pathway in osteosarcoma. To our knowledge, the implication of this pathway on Ewing sarcoma-associated angiogenesis has not been described yet.

It is well recognized that hypoxia is an important regulator of angiogenesis during tumor development [149]. A major regulator of hypoxia is the transcription factor hypoxia inducible factor 1 (HIF-1), composed of the oxygen regulated HIF-1 α subunit and the constitutively expressed HIF-1 β . Under the hypoxic TME, HIF-1 directly activates the transcription of pro-angiogenic genes including VEGF to promote angiogenesis [150,151] as demonstrated in osteosarcoma and Ewing sarcoma [152]. Thus, HIF-1 α silencing by siRNA reduces VEGF production by osteosarcoma cells in vitro and inhibits angiogenesis in a mouse model of osteosarcoma [153].

Besides its regulation of angiogenesis, hypoxia has been directly correlated to bone sarcoma progression, metastasis and patient prognosis. Thus, hypoxia enhances the expression and the transcriptional function of the fusion protein EWS/FLI1 in a HIF-1 α dependent-manner in Ewing sarcoma cells and consequently increases their invasiveness [154], HIF-1 α is also able to promote osteosarcoma cell proliferation and migration through activation of several signaling pathway including Akt and STAT3 signaling pathways [155,156]. Moreover, the expression of HIF-1 α has been correlated to the development of lung metastasis associated with poorer survival in osteosarcoma patients [157–159].

The implication of the Wnt/ β -catenin signaling pathway in hypoxia has mainly been reported in carcinoma. As an example, hypoxia promotes β -catenin nuclear localization related to a more invasive phenotype in colorectal adenocarcinoma cells [160]. Moreover, β -catenin directly interacts with HIF-1 α to promote HIF-1 mediated transcription allowing an enhanced survival and adaptation to hypoxia of colon cancer cells [161]. Although the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway seems to play a crucial role in hypoxia, only a few studies deal with its implication in the hypoxic TME of bone sarcoma. The most relevant one has described that inhibitors of the Wnt signaling pathway re-sensitizes osteosarcoma cells to doxorubicin under hypoxic conditions [162].

6.3. Wnt/ β -Catenin Pathway and the Immune System

The immune microenvironment of bone sarcomas is highly heterogeneous composed of effectors of the innate immunity such as natural killer (NK) cells, dendritic cells (DC) and tumor-associated macrophages (TAMs) and cytotoxic T cells which drive adaptive immunity [33,35]. Nevertheless, immune and inflammatory infiltrates remain lower in Ewing sarcoma, limiting the development of immunotherapy [163].

Regarding innate immunity, bone sarcomas are mainly invaded by TAMs which have been associated with a good prognosis in osteosarcoma patients. However, as described above, it remains difficult to conclude about the role of M2-polarized macrophages in osteosarcoma progression, probably because of the difficulty to clearly identify the different TAMs subtypes in tumors and by the fact that, in contrast to the binary M1/M2 subtype, TAMs correspond to several distinct populations that often share features of both subtypes [164]. In Ewing sarcoma, a first study has initially described a correlation between macrophages infiltrate and poor prognosis but a second one did not observe any correlation between CD68⁺ macrophages and survival [39,40]. The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway seems to drive the polarization of macrophages in cancers. Indeed, hepatic tumor cells produce Wnt ligands that enhance M2 macrophages polarization through the Wnt/ β -catenin signaling pathway, resulting in increased primary and metastatic tumor development [165] (Figure 2e).

T lymphocytes in cancer, also known as tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), correspond to the second most important immune cells in osteosarcoma [33,166]. TILs had higher cytotoxic capacities against tumor cells than peripheral lymphocytes but immunomodulatory molecules present in the TME prevent their expansion and activation. In particular, ligands of the B7 family are usually expressed by tumor cells in order to modulate T lymphocytes activities [167]. Osteosarcoma cells express HERV-H LTR-associating 2 (HHLA2), PDL-1 and B7-H3, three members of the B7 proteins that contribute to local immunosuppression. HHLA2 expression has been associated with metastatic properties of osteosarcoma cells and poor survival of osteosarcoma patients [168,169]. The binding

of PDL-1, expressed by osteosarcoma cells to PD-1 on TILs induces the inhibition of their cytotoxic activities, contributing to local immunosuppression and consequently to tumor development. On the contrary, Ewing sarcoma does not constitutively express PDL-1 although its expression could be induced under inflammatory conditions [170]. Thus, only one case of the response of Ewing sarcoma to the blockade of PD-1/PDL-1 interaction has been described [171]. Finally, osteosarcoma cells also express B7-H3 which is correlated with tumor aggressiveness and metastasis [172,173]. In this context, Wnt/ β -catenin pathway activation in the TME seems to inhibit T cell infiltration and functions in several cancers [174,175]. Moreover, the active Wnt/ β -catenin signaling pathway has been associated with T cell exclusion leading to resistance to anti-PDL-1 therapy in human melanoma [176] (Figure 2e). Similarly, β -catenin activation enhances immune evasion and induces resistance to anti-PD1 therapy in hepatocellular carcinoma [177].

Another important point is that cross regulations between TAMs and TILs play a key role in osteosarcoma development. Thus, M2-polarized macrophages promote the suppression of TILs in osteosarcoma and, conversely, anti-PD1 therapy targeting TILs is able to stimulate a transition from M2 macrophages to M1 macrophages, leading to a decrease in lung metastases [41,178].

Finally, it seems important to note that, besides TAMs and TILs, the Wnt/ β -catenin pathway is able to modulate the proliferation, recruitment, and/or functions of the different effectors of the immune system and to regulate multiple aspects of the immune cells/tumor crosstalk. As an example, Wnt ligands secreted by tumor cells can activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway in DC, leading to up regulated interleukin-10 and indoleamine 2,3-dioxygenase 1 secretion. This results in an increase in regulatory T cells inside the tumor and consequently an inhibition of TILs cytotoxic properties [179].

7. Conclusions

The canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway plays a crucial role during the different steps of bone sarcoma growth and the metastatic process, although its involvement has been more studied in osteosarcoma than in Ewing sarcoma. This pathway seems to promote bone sarcoma development through both a direct effect on bone sarcoma cells and an indirect modulation of the bone TME cell activities. Thus, aberrant activation of the canonical Wnt signaling pathway in osteosarcoma cells seems to be highly involved in cell proliferation, induction of an EMT-like process, acquisition of stem cells properties of osteosarcoma CSCs as well as metastatic dissemination. The Wnt/ β -catenin pathway activation does not affect the proliferation of Ewing sarcoma cells but appears to play a role in the cellular motility of these cells. The Wnt/ β -catenin pathway also participates to the hijacking of the bone TME by the bone sarcoma cells, promoting modulation of the ECM to allow the tumor cells invasiveness and inducing immune tolerance and angiogenesis in the TME. This results in an increase in metastatic dissemination.

The crucial role of the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway is not restricted to bone sarcoma. That is why different therapeutic strategies targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancers have been developed. Corresponding clinical trials have been recently described in details in two reviews [67,174]. Briefly, they include inhibitors of porcupin, the enzyme responsible for palmitoylation of Wnt ligands, a necessary process to allow their extracellular secretion (LGK974 or WNT974), anti-Fzd antibodies (OMP18R5) or inhibitors of the β -catenin transcriptional complex (PRI724), mainly evaluated in patients with solid tumors.

The complexity of the Wnt signaling offers multiple targets to reduce β -catenin activation in tumor cells. However, better knowledge about the role of Wnt/ β -catenin in each tumor cell type, in particular, osteosarcoma and Ewing sarcoma, is necessary to safely target this pathway. It is also necessary to focus on crosstalks between the Wnt/ β -catenin and other signaling pathways during bone sarcoma growth and metastatic processes.

Author Contributions: All authors have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

Acknowledgments: The figures were produced with the support of Servier Medical Art (www.servier.com).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

APC	Adenomatous Polyposis Coli
BCL-9	B cell CLL/lymphoma 9
β -TrCP	beta-Transducin-repeat-Containing Protein
BRG1	Brahma-related gene 1
CBP	CREB (cAMP-Response Element Binding protein) binding protein
CCL	C-C motif ligand
CK1 α	Casein Kinase 1 alpha
CSC	Cancer Stem Cell
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
DC	Dendritic cell
DKK	Dickkopf
Dvl	Dishevelled
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ETS	E26 Transformation-Specific
Fzd	Frizzled
GSK3 β	Glycogen synthase kinase 3 beta
HDAC	histone deacetylase
HHLA2	HERV-H LTR-associating 2
HIF-1	Hypoxia Inducible Factor 1
IFN γ	Interferon γ
IGFBP4	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 4
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
LEF	Lymphoid Enhancer-binding Factor
LGR5	Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5
lncRNA	long non-coding RNA
LRP	Lipoprotein Receptor-related Protein
miR	miRNA
MMP	Matrix Metalloproteinase
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MT1-MMP	Membrane type 1 metalloprotease
NK	Natural killer
NKD2	Naked cuticle homolog 2
PCP	Planar Cell Polarity
PD-1	Programmed cell Death 1
PDL-1	Programmed cell Death Ligand 1
PLOD2	Procollagen-Lysine, 2-Oxoglutarate 5-Dioxygenase 2
ROR	Receptor tyrosine-kinase-like Orphan Receptor
RSPO	R-spondin
Ryk	Related to tyrosine kinase
SFRP	Secreted-Fzd-Related Protein
SOST	Sclerostin
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAF	Tumor Associated Fibroblast
TAM	Tumor Associated Macrophage
TAZ	Transcriptional co-Activator with a PDZ-binding domain
TCF	T-Cell Factor
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TLE	Transducin-Like Enhancer of split
TIL	Tumor Infiltrating Lymphocyte

TME	Tumor MicroEnvironment
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WIF1	Wnt Inhibitory Factor 1
WTX	Wilms tumor gene on X chromosome
YAP	Yes-Associated Protein

References

- Ladenstein, R.; Pötschger, U.; Le Deley, M.C.; Whelan, J.; Paulussen, M.; Oberlin, O.; van den Berg, H.; Dirksen, U.; Hjorth, L.; Michon, J.; et al. Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: Results of the Euro-EWING 99 trial. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3284–3291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mirabello, L.; Troisi, R.J.; Savage, S.A. International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages, and elderly persons. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 229–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mirabello, L.; Troisi, R.J.; Savage, S.A. Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: Data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. *Cancer* **2009**, *115*, 1531–1543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rodríguez-Galindo, C.; Navid, F.; Liu, T.; Billups, C.A.; Rao, B.N.; Krasin, M.J. Prognostic factors for local and distant control in Ewing sarcoma family of tumors. *Ann. Oncol.* **2008**, *19*, 814–820. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Strauss, S.J.; Whelan, J.S. Current questions in bone sarcomas. *Curr. Opin. Oncol.* **2018**, *30*, 252–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Delattre, O.; Zucman, J.; Plougastel, B.; Desmaze, C.; Melot, T.; Peter, M.; Kovar, H.; Joubert, I.; de Jong, P.; Rouleau, G. Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* **1992**, *359*, 162–165. [[CrossRef](#)]
- Delattre, O.; Zucman, J.; Melot, T.; Garau, X.S.; Zucker, J.M.; Lenoir, G.M.; Ambros, P.F.; Sheer, D.; Turc-Carel, C.; Triche, T.J. The Ewing family of tumors—A subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 294–299. [[CrossRef](#)]
- Ginsberg, J.P.; de Alava, E.; Ladanyi, M.; Wexler, L.H.; Kovar, H.; Paulussen, M.; Zoubek, A.; Dockhorn-Dworniczak, B.; Juergens, H.; Wunder, J.S.; et al. EWS-FLI1 and EWS-ERG gene fusions are associated with similar clinical phenotypes in Ewing’s sarcoma. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 1809–1814. [[CrossRef](#)]
- Lu, P.; Weaver, V.M.; Werb, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 395–406. [[CrossRef](#)]
- Hanahan, D.; Coussens, L.M. Accessories to the crime: Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **2012**, *21*, 309–322. [[CrossRef](#)]
- Crenn, V.; Biteau, K.; Amiaud, J.; Dumars, C.; Guiho, R.; Vidal, L.; Nail, L.-R.L.; Heymann, D.; Moreau, A.; Gouin, F.; et al. Bone microenvironment has an influence on the histological response of osteosarcoma to chemotherapy: Retrospective analysis and preclinical modeling. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 2333–2349.
- Alfranca, A.; Martinez-Cruzado, L.; Tornin, J.; Abarategi, A.; Amaral, T.; de Alava, E.; Menendez, P.; Garcia-Castro, J.; Rodriguez, R. Bone microenvironment signals in osteosarcoma development. *Cell. Mol. Life Sci.* **2015**, *72*, 3097–3113. [[CrossRef](#)]
- Klemm, F.; Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of therapeutic response in cancer. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 198–213. [[CrossRef](#)]
- Quail, D.F.; Joyce, J.A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1423–1437. [[CrossRef](#)]
- Jin, H.; Barrott, J.J.; Cable, M.G.; Monument, M.J.; Lerman, D.M.; Smith-Fry, K.; Nollner, D.; Jones, K.B. The Impact of Microenvironment on the Synovial Sarcoma Transcriptome. *Cancer Microenviron* **2017**, *10*, 1–7. [[CrossRef](#)]
- Goldstein, S.D.; Hayashi, M.; Albert, C.M.; Jackson, K.W.; Loeb, D.M. An orthotopic xenograft model with survival hindlimb amputation allows investigation of the effect of tumor microenvironment on sarcoma metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2015**, *32*, 703–715. [[CrossRef](#)]
- Riemann, A.; Schneider, B.; Gündel, D.; Stock, C.; Gekle, M.; Thews, O. Acidosis Promotes Metastasis Formation by Enhancing Tumor Cell Motility. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *876*, 215–220.

18. Chattopadhyay, S.; Chaklader, M.; Chatterjee, R.; Law, A.; Law, S. Differential expression of mitotic regulators and tumor microenvironment influences the regional growth pattern of solid sarcoma along the cranio-caudal axis. *Exp. Cell Res.* **2016**, *340*, 91–101. [[CrossRef](#)]
19. Lamoureux, F.; Richard, P.; Wittrant, Y.; Battaglia, S.; Pilet, P.; Trichet, V.; Blanchard, F.; Gouin, F.; Pitard, B.; Heymann, D.; et al. Therapeutic relevance of osteoprotegerin gene therapy in osteosarcoma: Blockade of the vicious cycle between tumor cell proliferation and bone resorption. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 7308–7318. [[CrossRef](#)]
20. Picarda, G.; Matous, E.; Amiaud, J.; Charrier, C.; Lamoureux, F.; Heymann, M.-F.; Tirode, F.; Pitard, B.; Trichet, V.; Heymann, D.; et al. Osteoprotegerin inhibits bone resorption and prevents tumor development in a xenogenic model of Ewing's sarcoma by inhibiting RANKL. *J. Bone Oncol.* **2013**, *2*, 95–104. [[CrossRef](#)]
21. Taylor, R.; Knowles, H.J.; Athanasou, N.A. Ewing sarcoma cells express RANKL and support osteoclastogenesis. *J. Pathol.* **2011**, *225*, 195–202. [[CrossRef](#)]
22. Dass, C.R.; Choong, P.F.M. Zoledronic acid inhibits osteosarcoma growth in an orthotopic model. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 3263–3270. [[CrossRef](#)]
23. Heymann, D.; Ory, B.; Blanchard, F.; Heymann, M.-F.; Coipeau, P.; Charrier, C.; Couillaud, S.; Thierry, J.P.; Gouin, F.; Redini, F. Enhanced tumor regression and tissue repair when zoledronic acid is combined with ifosfamide in rat osteosarcoma. *Bone* **2005**, *37*, 74–86. [[CrossRef](#)]
24. Odri, G.A.; Dumoucel, S.; Picarda, G.; Battaglia, S.; Lamoureux, F.; Corradini, N.; Rousseau, J.; Tirode, F.; Laud, K.; Delattre, O.; et al. Zoledronic acid as a new adjuvant therapeutic strategy for Ewing's sarcoma patients. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7610–7619. [[CrossRef](#)]
25. Ory, B.; Heymann, M.-F.; Kamijo, A.; Gouin, F.; Heymann, D.; Redini, F. Zoledronic acid suppresses lung metastases and prolongs overall survival of osteosarcoma-bearing mice. *Cancer* **2005**, *104*, 2522–2529. [[CrossRef](#)]
26. Han, Y.; Wu, C.; Wang, J.; Liu, N. CXCR7 maintains osteosarcoma invasion after CXCR4 suppression in bone marrow microenvironment. *Tumour Biol.* **2017**, *39*, 101042831770163. [[CrossRef](#)]
27. Li, Y.-J.; Dai, Y.-L.; Zhang, W.-B.; Li, S.-J.; Tu, C.-Q. Clinicopathological and prognostic significance of chemokine receptor CXCR4 in patients with bone and soft tissue sarcoma: A meta-analysis. *Clin. Exp. Med.* **2017**, *17*, 59–69. [[CrossRef](#)]
28. Perissinotto, E.; Cavalloni, G.; Leone, F.; Fonsato, V.; Mitola, S.; Grignani, G.; Surrenti, N.; Sangiolo, D.; Bussolino, F.; Piacibello, W.; et al. Involvement of chemokine receptor 4/stromal cell-derived factor 1 system during osteosarcoma tumor progression. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 490–497.
29. Cortini, M.; Massa, A.; Avnet, S.; Bonuccelli, G.; Baldini, N. Tumor-Activated Mesenchymal Stromal Cells Promote Osteosarcoma Stemness and Migratory Potential via IL-6 Secretion. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0166500. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, Y.; Ma, Q.; Liu, T.; Guan, G.; Zhang, K.; Chen, J.; Jia, N.; Yan, S.; Chen, G.; Liu, S.; et al. Interleukin-6 suppression reduces tumour self-seeding by circulating tumour cells in a human osteosarcoma nude mouse model. *Oncotarget* **2016**, *7*, 446–458. [[CrossRef](#)]
31. Qi, J.; Zhou, Y.; Jiao, Z.; Wang, X.; Zhao, Y.; Li, Y.; Chen, H.; Yang, L.; Zhu, H.; Li, Y. Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Tumor Growth Through Hedgehog Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42*, 2242–2254. [[CrossRef](#)]
32. Wang, Y.; Chu, Y.; Yue, B.; Ma, X.; Zhang, G.; Xiang, H.; Liu, Y.; Wang, T.; Wu, X.; Chen, B. Adipose-derived mesenchymal stem cells promote osteosarcoma proliferation and metastasis by activating the STAT3 pathway. *Oncotarget* **2017**, *8*, 23803–23816. [[CrossRef](#)]
33. Heymann, M.-F.; Lézot, F.; Heymann, D. The contribution of immune infiltrates and the local microenvironment in the pathogenesis of osteosarcoma. *Cell. Immunol.* **2017**. [[CrossRef](#)]
34. Noy, R.; Pollard, J.W. Tumor-associated macrophages: From mechanisms to therapy. *Immunity* **2014**, *41*, 49–61. [[CrossRef](#)]
35. Gomez-Brouchet, A.; Illac, C.; Gilhodes, J.; Bouvier, C.; Aubert, S.; Guinebretiere, J.-M.; Marie, B.; Larousserie, F.; Entz-Werlé, N.; de Pinieux, G.; et al. CD163-positive tumor-associated macrophages and CD8-positive cytotoxic lymphocytes are powerful diagnostic markers for the therapeutic stratification of osteosarcoma patients: An immunohistochemical analysis of the biopsies from the French OS2006 phase 3 trial. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1331193.

36. Buddingh, E.P.; Kuijjer, M.L.; Duim, R.A.J.; Bürger, H.; Agelopoulos, K.; Myklebost, O.; Serra, M.; Mertens, F.; Hogendoorn, P.C.W.; Lankester, A.C.; et al. Tumor-infiltrating macrophages are associated with metastasis suppression in high-grade osteosarcoma: A rationale for treatment with macrophage activating agents. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 2110–2119. [[CrossRef](#)]
37. Dumars, C.; Ngyuen, J.-M.; Gaultier, A.; Lanel, R.; Corradini, N.; Gouin, F.; Heymann, D.; Heymann, M.-F. Dysregulation of macrophage polarization is associated with the metastatic process in osteosarcoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 78343–78354. [[CrossRef](#)]
38. Zhou, Q.; Xian, M.; Xiang, S.; Xiang, D.; Shao, X.; Wang, J.; Cao, J.; Yang, X.; Yang, B.; Ying, M.; et al. All-Trans Retinoic Acid Prevents Osteosarcoma Metastasis by Inhibiting M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 547–559. [[CrossRef](#)]
39. Fujiwara, T.; Fukushi, J.; Yamamoto, S.; Matsumoto, Y.; Setsu, N.; Oda, Y.; Yamada, H.; Okada, S.; Watari, K.; Ono, M.; et al. Macrophage infiltration predicts a poor prognosis for human ewing sarcoma. *Am. J. Pathol.* **2011**, *179*, 1157–1170. [[CrossRef](#)]
40. Handl, M.; Hermanova, M.; Hotarkova, S.; Jarkovsky, J.; Mudry, P.; Shatokhina, T.; Vesela, M.; Sterba, J.; Zambo, I. Clinicopathological correlation of tumor-associated macrophages in Ewing sarcoma. *Biomed. Pap. Med. Fac. Palacky Univ. Olomouc* **2018**, *162*, 54–60. [[CrossRef](#)]
41. Han, Q.; Shi, H.; Liu, F. CD163(+) M2-type tumor-associated macrophage support the suppression of tumor-infiltrating T cells in osteosarcoma. *Int. Immunopharmacol.* **2016**, *34*, 101–106. [[CrossRef](#)]
42. Chang, C.-H.; Qiu, J.; O'Sullivan, D.; Buck, M.D.; Noguchi, T.; Curtis, J.D.; Chen, Q.; Gindin, M.; Gubin, M.M.; van der Windt, G.J.W.; et al. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **2015**, *162*, 1229–1241. [[CrossRef](#)]
43. Lewis, D.M.; Pruitt, H.; Jain, N.; Ciccaglione, M.; McCaffery, J.M.; Xia, Z.; Weber, K.; Eisinger-Mathason, T.S.K.; Gerecht, S. A Feedback Loop between Hypoxia and Matrix Stress Relaxation Increases Oxygen-Axis Migration and Metastasis in Sarcoma. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 1981–1995. [[CrossRef](#)]
44. Itoh, H.; Kadomatsu, T.; Tanoue, H.; Yugami, M.; Miyata, K.; Endo, M.; Morinaga, J.; Kobayashi, E.; Miyamoto, T.; Kurahashi, R.; et al. TET2-dependent IL-6 induction mediated by the tumor microenvironment promotes tumor metastasis in osteosarcoma. *Oncogene* **2018**, *37*, 2903–2920. [[CrossRef](#)]
45. Hawkins, A.G.; Basrur, V.; da Veiga Leprevost, F.; Pedersen, E.; Sperring, C.; Nesvizhskii, A.I.; Lawlor, E.R. The Ewing Sarcoma Secretome and Its Response to Activation of Wnt/beta-catenin Signaling. *Mol. Cell. Proteom.* **2018**, *17*, 901–912. [[CrossRef](#)]
46. Volchenboum, S.L.; Andrade, J.; Huang, L.; Barkauskas, D.A.; Krailo, M.; Womer, R.B.; Ranft, A.; Potratz, J.; Dirksen, U.; Triche, T.J.; et al. Gene expression profiling of Ewing sarcoma tumours reveals the prognostic importance of tumour–stromal interactions: A report from the Children’s Oncology Group. *J. Pathol. Clin. Res.* **2015**, *1*, 83–94. [[CrossRef](#)]
47. Sand, L.G.L.; Berghuis, D.; Szuhai, K.; Hogendoorn, P.C.W. Expression of CCL21 in Ewing sarcoma shows an inverse correlation with metastases and is a candidate target for immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *65*, 995–1002. [[CrossRef](#)]
48. Piperno-Neumann, S.; Le Deley, M.-C.; Rédini, F.; Pacquement, H.; Marec-Bérard, P.; Petit, P.; Brisse, H.; Lervat, C.; Gentet, J.-C.; Entz-Werlé, N.; et al. Zoledronate in combination with chemotherapy and surgery to treat osteosarcoma (OS2006): A randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1070–1080. [[CrossRef](#)]
49. Paydas, S.; Bagir, E.K.; Deveci, M.A.; Gonlusen, G. Clinical and prognostic significance of PD-1 and PD-L1 expression in sarcomas. *Med. Oncol.* **2016**, *33*, 93. [[CrossRef](#)]
50. Lussier, D.M.; O’Neill, L.; Nieves, L.M.; McAfee, M.S.; Holechek, S.A.; Collins, A.W.; Dickman, P.; Jacobsen, J.; Hingorani, P.; Blattman, J.N. Enhanced T-cell immunity to osteosarcoma through antibody blockade of PD-1/PD-L1 interactions. *J. Immunother.* **2015**, *38*, 96–106. [[CrossRef](#)]
51. Shen, J.K.; Cote, G.M.; Choy, E.; Yang, P.; Harmon, D.; Schwab, J.; Nielsen, G.P.; Chebib, I.; Ferrone, S.; Wang, X.; et al. Programmed cell death ligand 1 expression in osteosarcoma. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 690–698. [[CrossRef](#)]
52. Sundara, Y.T.; Kostine, M.; Cleven, A.H.G.; Bovée, J.V.M.G.; Schilham, M.W.; Cleton-Jansen, A.-M. Increased PD-L1 and T-cell infiltration in the presence of HLA class I expression in metastatic high-grade osteosarcoma: A rationale for T-cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2017**, *66*, 119–128. [[CrossRef](#)]

53. Duchartre, Y.; Kim, Y.-M.; Kahn, M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2016**, *99*, 141–149. [[CrossRef](#)]
54. Polakis, P. Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a008052. [[CrossRef](#)]
55. Tai, D.; Wells, K.; Arcaroli, J.; Vanderbilt, C.; Aisner, D.L.; Messersmith, W.A.; Lieu, C.H. Targeting the WNT Signaling Pathway in Cancer Therapeutics. *Oncologist* **2015**, *20*, 1189–1198. [[CrossRef](#)]
56. Major, M.B.; Camp, N.D.; Berndt, J.D.; Yi, X.; Goldenberg, S.J.; Hubbert, C.; Biechele, T.L.; Gingras, A.-C.; Zheng, N.; Maccoss, M.J.; et al. Wilms tumor suppressor WTX negatively regulates WNT/beta-catenin signaling. *Science* **2007**, *316*, 1043–1046. [[CrossRef](#)]
57. Azzolin, L.; Panciera, T.; Soligo, S.; Enzo, E.; Bicciato, S.; Dupont, S.; Bresolin, S.; Frasson, C.; Basso, G.; Guzzardo, V.; et al. YAP/TAZ incorporation in the β -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell* **2014**, *158*, 157–170. [[CrossRef](#)]
58. Kim, S.-E.; Huang, H.; Zhao, M.; Zhang, X.; Zhang, A.; Semonov, M.V.; MacDonald, B.T.; Zhang, X.; Garcia Abreu, J.; Peng, L.; et al. Wnt stabilization of β -catenin reveals principles for morphogen receptor-scaffold assemblies. *Science* **2013**, *340*, 867–870. [[CrossRef](#)]
59. Liu, C.; Li, Y.; Semenov, M.; Han, C.; Baeg, G.-H.; Tan, Y.; Zhang, Z.; Lin, X.; He, X. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell* **2002**, *108*, 837–847. [[CrossRef](#)]
60. Robertson, H.; Hayes, J.D.; Sutherland, C. A partnership with the proteasome; the destructive nature of GSK3. *Biochem. Pharmacol.* **2018**, *147*, 77–92. [[CrossRef](#)]
61. Stamos, J.L.; Weis, W.I. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a007898. [[CrossRef](#)]
62. Chodaparambil, J.V.; Pate, K.T.; Hepler, M.R.D.; Tsai, B.P.; Muthurajan, U.M.; Luger, K.; Waterman, M.L.; Weis, W.I. Molecular functions of the TLE tetramerization domain in Wnt target gene repression. *EMBO J.* **2014**, *33*, 719–731. [[CrossRef](#)]
63. Li, V.S.W.; Ng, S.S.; Boersema, P.J.; Low, T.Y.; Karthaus, W.R.; Gerlach, J.P.; Mohammed, S.; Heck, A.J.R.; Maurice, M.M.; Mahmoudi, T.; et al. Wnt signaling through inhibition of β -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell* **2012**, *149*, 1245–1256. [[CrossRef](#)]
64. Lien, W.-H.; Fuchs, E. Wnt some lose some: Transcriptional governance of stem cells by Wnt/-catenin signaling. *Genes Dev.* **2014**, *28*, 1517–1532. [[CrossRef](#)]
65. MacDonald, B.T.; Tamai, K.; He, X. Wnt/beta-catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 9–26. [[CrossRef](#)]
66. Baron, R.; Kneissel, M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: From human mutations to treatments. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 179–192. [[CrossRef](#)]
67. Ghosh, N.; Hossain, U.; Mandal, A.; Sil, P.C. The Wnt signaling pathway: A potential therapeutic target against cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1443*, 54–74. [[CrossRef](#)]
68. Zhan, T.; Rindtorff, N.; Boutros, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene* **2017**, *36*, 1461–1473. [[CrossRef](#)]
69. Ishibashi, M. Screening for natural products that affect Wnt signaling activity. *J. Nat. Med.* **2019**, 1–9. [[CrossRef](#)]
70. Le, P.N.; McDermott, J.D.; Jimeno, A. Targeting the Wnt pathway in human cancers: Therapeutic targeting with a focus on OMP-54F28. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *146*, 1–11. [[CrossRef](#)]
71. Tabatabai, R.; Linhares, Y.; Bolos, D.; Mita, M.; Mita, A. Targeting the Wnt Pathway in Cancer: A Review of Novel Therapeutics. *Target Oncol.* **2017**, *12*, 623–641. [[CrossRef](#)]
72. Tran, F.H.; Zheng, J.J. Modulating the wnt signaling pathway with small molecules: Modulating the Wnt Signaling Pathway. *Protein Sci.* **2017**, *26*, 650–661. [[CrossRef](#)]
73. Zhang, X.; Hao, J. Development of anticancer agents targeting the Wnt/ β -catenin signaling. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 2344–2360.
74. Harb, J.; Lin, P.-J.; Hao, J. Recent Development of Wnt Signaling Pathway Inhibitors for Cancer Therapeutics. *Curr. Oncol. Rep.* **2019**, *21*, 12. [[CrossRef](#)]
75. Krishnamurthy, N.; Kurzrock, R. Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *62*, 50–60. [[CrossRef](#)]
76. Kahn, M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 513–532. [[CrossRef](#)]
77. Chen, C.; Zhao, M.; Tian, A.; Zhang, X.; Yao, Z.; Ma, X. Aberrant activation of Wnt/ β -catenin signaling drives proliferation of bone sarcoma cells. *Oncotarget* **2015**, *6*, 17570–17583. [[CrossRef](#)]

78. Iwaya, K.; Ogawa, H.; Kuroda, M.; Izumi, M.; Ishida, T.; Mukai, K. Cytoplasmic and/or nuclear staining of beta-catenin is associated with lung metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2003**, *20*, 525–529. [[CrossRef](#)]
79. Liu, W.; Zhao, Z.; Wang, Y.; Li, W.; Su, Q.; Jia, Q.; Zhang, J.; Zhang, X.; Shen, J.; Yin, J. Dioscin inhibits stem-cell-like properties and tumor growth of osteosarcoma through Akt/GSK3/β-catenin signaling pathway. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 343. [[CrossRef](#)]
80. Lu, Y.; Guan, G.-F.; Chen, J.; Hu, B.; Sun, C.; Ma, Q.; Wen, Y.-H.; Qiu, X.-C.; Zhou, Y. Aberrant CXCR4 and β-catenin expression in osteosarcoma correlates with patient survival. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 2123–2129. [[CrossRef](#)]
81. Cai, Y.; Mohseny, A.B.; Karperien, M.; Hogendoorn, P.C.W.; Zhou, G.; Cleton-Jansen, A.-M. Inactive Wnt/beta-catenin pathway in conventional high-grade osteosarcoma. *J. Pathol.* **2010**, *220*, 24–33. [[CrossRef](#)]
82. Cleton-Jansen, A.-M.; Anninga, J.K.; Briaire-de Bruijn, I.H.; Romeo, S.; Oosting, J.; Egeler, R.M.; Gelderblom, H.; Taminiau, A.H.M.; Hogendoorn, P.C.W. Profiling of high-grade central osteosarcoma and its putative progenitor cells identifies tumorigenic pathways. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 1909–1918. [[CrossRef](#)]
83. Du, X.; Yang, J.; Yang, D.; Tian, W.; Zhu, Z. The genetic basis for inactivation of Wnt pathway in human osteosarcoma. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 450. [[CrossRef](#)]
84. Shimozaki, S.; Yamamoto, N.; Domoto, T.; Nishida, H.; Hayashi, K.; Kimura, H.; Takeuchi, A.; Miwa, S.; Igarashi, K.; Kato, T.; et al. Efficacy of glycogen synthase kinase-3β targeting against osteosarcoma via activation of β-catenin. *Oncotarget* **2016**, *7*, 77038–77051. [[CrossRef](#)]
85. Jie, X.-X.; Zhang, X.-Y.; Xu, C.-J. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget* **2017**, *8*, 81558–81571. [[CrossRef](#)]
86. Lei, P.; Ding, D.; Xie, J.; Wang, L.; Liao, Q.; Hu, Y. Expression profile of Twist, vascular endothelial growth factor and CD34 in patients with different phases of osteosarcoma. *Oncol. Lett.* **2015**, *10*, 417–421. [[CrossRef](#)]
87. Sharili, A.-S.; Allen, S.; Smith, K.; Hargreaves, J.; Price, J.; McGonnell, I. Expression of Snail2 in long bone osteosarcomas correlates with tumour malignancy. *Tumour Biol.* **2011**, *32*, 515–526. [[CrossRef](#)]
88. Shen, A.; Zhang, Y.; Yang, H.; Xu, R.; Huang, G. Overexpression of ZEB1 relates to metastasis and invasion in osteosarcoma. *J. Surg. Oncol.* **2012**, *105*, 830–834. [[CrossRef](#)]
89. Yang, G.; Yuan, J.; Li, K. EMT transcription factors: Implication in osteosarcoma. *Med. Oncol.* **2013**, *30*, 697. [[CrossRef](#)]
90. Verrecchia, F.; Rédini, F. Transforming Growth Factor-β Signaling Plays a Pivotal Role in the Interplay Between Osteosarcoma Cells and Their Microenvironment. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 133. [[CrossRef](#)]
91. Fuxe, J.; Vincent, T.; de Garcia Herreros, A. Transcriptional crosstalk between TGF-β and stem cell pathways in tumor cell invasion: Role of EMT promoting Smad complexes. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 2363–2374. [[CrossRef](#)]
92. Tian, H.; Zhou, T.; Chen, H.; Li, C.; Jiang, Z.; Lao, L.; Kahn, S.A.; Duarte, M.E.L.; Zhao, J.; Daubs, M.D.; et al. Bone morphogenetic protein-2 promotes osteosarcoma growth by promoting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through the Wnt/β-catenin signaling pathway. *J. Orthop. Res.* **2019**, *37*, 1638–1648. [[CrossRef](#)]
93. Wang, S.; Zhang, D.; Han, S.; Gao, P.; Liu, C.; Li, J.; Pan, X. Fibulin-3 promotes osteosarcoma invasion and metastasis by inducing epithelial to mesenchymal transition and activating the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 6215. [[CrossRef](#)]
94. Fan, S.; Gao, X.; Chen, P.; Li, X. Carboxypeptidase E-ΔN promotes migration, invasiveness, and epithelial-mesenchymal transition of human osteosarcoma cells via the Wnt-β-catenin pathway. *Biochem. Cell Biol.* **2018**, 1–8. [[CrossRef](#)]
95. Zeng, Q.; Li, Z.; Zhao, X.; Guo, L.; Yu, C.; Qin, J.; Zhang, S.; Zhang, Y.; Yang, X. Ubiquitin-specific protease 7 promotes osteosarcoma cell metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncol. Rep.* **2019**, *41*, 543–551. [[CrossRef](#)]
96. Cai, Z.; Cao, Y.; Luo, Y.; Hu, H.; Ling, H. Signalling mechanism(s) of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in tumour therapeutic resistance. *Clin. Chim. Acta* **2018**, *483*, 156–163. [[CrossRef](#)]
97. Takebe, N.; Miele, L.; Harris, P.J.; Jeong, W.; Bando, H.; Kahn, M.; Yang, S.X.; Ivy, S.P. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: Clinical update. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 445–464. [[CrossRef](#)]
98. Adhikari, A.S.; Agarwal, N.; Wood, B.M.; Porretta, C.; Ruiz, B.; Pochampally, R.R.; Iwakuma, T. CD117 and Stro-1 identify osteosarcoma tumor-initiating cells associated with metastasis and drug resistance. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4602–4612. [[CrossRef](#)]

99. Siclari, V.A.; Qin, L. Targeting the osteosarcoma cancer stem cell. *J. Orthop. Surg. Res.* **2010**, *5*, 78. [[CrossRef](#)]
100. Martins-Neves, S.R.; Corver, W.E.; Paiva-Oliveira, D.I.; van den Akker, B.E.W.M.; Briaire-de-Bruijn, I.H.; Bovée, J.V.M.G.; Gomes, C.M.F.; Cleton-Jansen, A.-M. Osteosarcoma Stem Cells Have Active Wnt/ β -catenin and Overexpress SOX2 and KLF4. *J. Cell. Physiol.* **2016**, *231*, 876–886. [[CrossRef](#)]
101. Cai, W.; Xu, Y.; Yin, J.; Zuo, W.; Su, Z. miR-552-5p facilitates osteosarcoma cell proliferation and metastasis by targeting WIF1. *Exp. Ther. Med.* **2019**, *17*, 3781–3788. [[CrossRef](#)]
102. Liu, Y.; Wang, Y.; Yang, H.; Zhao, L.; Song, R.; Tan, H.; Wang, L. MicroRNA-873 targets HOXA9 to inhibit the aggressive phenotype of osteosarcoma by deactivating the Wnt/ β -catenin pathway. *Int. J. Oncol.* **2019**, *54*, 1809–1820. [[CrossRef](#)]
103. Liu, Y.; Bao, Z.; Tian, W.; Huang, G. miR-885-5p suppresses osteosarcoma proliferation, migration and invasion through regulation of β -catenin. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 1996–2004. [[CrossRef](#)]
104. Ren, J.; Yang, M.; Xu, F.; Chen, J. microRNA-758 inhibits the malignant phenotype of osteosarcoma cells by directly targeting HMGA1 and deactivating the Wnt/ β -catenin pathway. *Am. J. Cancer Res.* **2019**, *9*, 36–52.
105. Xia, P.; Gu, R.; Zhang, W.; Shao, L.; Li, F.; Wu, C.; Sun, Y. MicroRNA-377 exerts a potent suppressive role in osteosarcoma through the involvement of the histone acetyltransferase 1-mediated Wnt axis. *J. Cell. Physiol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
106. Li, C.; Wang, F.; Wei, B.; Wang, L.; Kong, D. LncRNA AWPPH promotes osteosarcoma progression via activation of Wnt/ β -catenin pathway through modulating miR-93-3p/FZD7 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *514*, 1017–1022. [[CrossRef](#)]
107. Lin, C.H.; Ji, T.; Chen, C.-F.; Hoang, B.H. Wnt signaling in osteosarcoma. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *804*, 33–45.
108. Pridgeon, M.G.; Grohar, P.J.; Steensma, M.R.; Williams, B.O. Wnt Signaling in Ewing Sarcoma, Osteosarcoma, and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2017**, *15*, 239–246. [[CrossRef](#)]
109. Pedersen, E.A.; Menon, R.; Bailey, K.M.; Thomas, D.G.; Van Noord, R.A.; Tran, J.; Wang, H.; Qu, P.P.; Hoering, A.; Fearon, E.R.; et al. Activation of Wnt/beta-catenin in Ewing sarcoma cells antagonizes EWS/ETS function and promotes phenotypic transition to more metastatic cell states. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 5040–5053. [[CrossRef](#)]
110. Scannell, C.A.; Pedersen, E.A.; Mosher, J.T.; Krook, M.A.; Nicholls, L.A.; Wilky, B.A.; Loeb, D.M.; Lawlor, E.R. LGR5 is Expressed by Ewing Sarcoma and Potentiates Wnt/ β -Catenin Signaling. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 81. [[CrossRef](#)]
111. Uren, A.; Wolf, V.; Sun, Y.-F.; Azari, A.; Rubin, J.S.; Toretsky, J.A. Wnt/Frizzled signaling in Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer* **2004**, *43*, 243–249. [[CrossRef](#)]
112. Endo, Y.; Beauchamp, E.; Woods, D.; Taylor, W.G.; Toretsky, J.A.; Uren, A.; Rubin, J.S. Wnt-3a and Dickkopf-1 stimulate neurite outgrowth in Ewing tumor cells via a Frizzled3- and c-Jun N-terminal kinase-dependent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 2368–2379. [[CrossRef](#)]
113. Navarro, D.; Agra, N.; Pestaña, A.; Alonso, J.; González-Sancho, J.M. The EWS/FLI1 oncogenic protein inhibits expression of the Wnt inhibitor DICKKOPF-1 gene and antagonizes beta-catenin/TCF-mediated transcription. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 394–401. [[CrossRef](#)]
114. Hayashi, M.; Baker, A.; Goldstein, S.D.; Albert, C.M.; Jackson, K.W.; McCarty, G.; Kahlert, U.D.; Loeb, D.M. Inhibition of porcupine prolongs metastasis free survival in a mouse xenograft model of Ewing sarcoma. *Oncotarget* **2017**, *8*, 78265–78276. [[CrossRef](#)]
115. Brown, H.K.; Schiavone, K.; Gouin, F.; Heymann, M.-F.; Heymann, D. Biology of Bone Sarcomas and New Therapeutic Developments. *Calcif. Tissue Int.* **2018**, *102*, 174–195. [[CrossRef](#)]
116. Pederson, L.; Ruan, M.; Westendorf, J.J.; Khosla, S.; Oursler, M.J. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 20764–20769. [[CrossRef](#)]
117. Westendorf, J.J.; Kahler, R.A.; Schroeder, T.M. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* **2004**, *341*, 19–39. [[CrossRef](#)]
118. Zhong, Z.; Zylstra-Diegel, C.R.; Schumacher, C.A.; Baker, J.J.; Carpenter, A.C.; Rao, S.; Yao, W.; Guan, M.; Helms, J.A.; Lane, N.E.; et al. Wntless functions in mature osteoblasts to regulate bone mass. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, E2197–E2204. [[CrossRef](#)]
119. Weivoda, M.M.; Ruan, M.; Hachfeld, C.M.; Pederson, L.; Howe, A.; Davey, R.A.; Zajac, J.D.; Kobayashi, Y.; Williams, B.O.; Westendorf, J.J.; et al. Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways. *J. Bone Miner. Res.* **2016**, *31*, 65–75. [[CrossRef](#)]


120. Sadanandam, A.; Futakuchi, M.; Lyssiotis, C.A.; Gibb, W.J.; Singh, R.K. A cross-species analysis of a mouse model of breast cancer-specific osteolysis and human bone metastases using gene expression profiling. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 304. [[CrossRef](#)]
121. Bu, G.; Lu, W.; Liu, C.-C.; Selander, K.; Yoneda, T.; Hall, C.; Keller, E.T.; Li, Y. Breast cancer-derived Dickkopf1 inhibits osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression: Implication for breast cancer osteolytic bone metastases. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 1034–1042. [[CrossRef](#)]
122. Bjørnland, K.; Flatmark, K.; Pettersen, S.; Aaasen, A.O.; Fodstad, O.; Maelandsmo, G.M. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J. Surg. Res.* **2005**, *127*, 151–156. [[CrossRef](#)]
123. Kunz, P.; Sähr, H.; Lehner, B.; Fischer, C.; Seebach, E.; Fellenberg, J. Elevated ratio of MMP2/MMP9 activity is associated with poor response to chemotherapy in osteosarcoma. *BMC Cancer* **2016**, *16*, 223. [[CrossRef](#)]
124. Zhang, M.; Zhang, X. Association of MMP-2 expression and prognosis in osteosarcoma patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 14965–14970.
125. Zhou, J.; Liu, T.; Wang, W. Prognostic significance of matrix metalloproteinase 9 expression in osteosarcoma: A meta-analysis of 16 studies. *Medicine* **2018**, *97*, e13051. [[CrossRef](#)]
126. Mateo, E.C.; Motta, F.J.N.; de Paula Queiroz, R.G.; Scrideli, C.A.; Tone, L.G. Protein expression of matrix metalloproteinase (MMP-1, -2, -3, -9 and -14) in Ewing family tumors and medulloblastomas of pediatric patients. *J. Pediatr. Genet.* **2012**, *1*, 181–187.
127. Ye, C.; Yu, X.; Liu, X.; Zhan, P.; Nie, T.; Guo, R.; Liu, H.; Dai, M.; Zhang, B. Beclin-1 knockdown decreases proliferation, invasion and migration of Ewing sarcoma SK-ES-1 cells via inhibition of MMP-9. *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 3221–3225. [[CrossRef](#)]
128. Guo, Y.; Zi, X.; Koontz, Z.; Kim, A.; Xie, J.; Gorlick, R.; Holcombe, R.F.; Hoang, B.H. Blocking Wnt/LRP5 signaling by a soluble receptor modulates the epithelial to mesenchymal transition and suppresses met and metalloproteinases in osteosarcoma Saos-2 cells. *J. Orthop. Res.* **2007**, *25*, 964–971. [[CrossRef](#)]
129. Liu, B.; Li, G.; Wang, X.; Liu, Y. A furin inhibitor downregulates osteosarcoma cell migration by downregulating the expression levels of MT1-MMP via the Wnt signaling pathway. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 1033–1038. [[CrossRef](#)]
130. Zhang, F.; Chen, A.; Chen, J.; Yu, T.; Guo, F. Influence of β -catenin small interfering RNA on human osteosarcoma cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* **2011**, *31*, 353–358. [[CrossRef](#)]
131. Zhang, F.; Chen, A.; Chen, J.; Yu, T.; Guo, F. SiRNA-mediated silencing of beta-catenin suppresses invasion and chemosensitivity to doxorubicin in MG-63 osteosarcoma cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2011**, *12*, 239–245.
132. Lowy, C.M.; Oskarsson, T. Tenascin C in metastasis: A view from the invasive front. *Cell Adh. Migr.* **2015**, *9*, 112–124. [[CrossRef](#)]
133. Olsen, J.J.; Pohl, S.Ö.-G.; Deshmukh, A.; Visweswaran, M.; Ward, N.C.; Arfuso, F.; Agostino, M.; Dharmarajan, A. The Role of Wnt Signalling in Angiogenesis. *Clin. Biochem. Rev.* **2017**, *38*, 131–142.
134. Carmeliet, P.; Jain, R.K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 417–427. [[CrossRef](#)]
135. Mavrogenis, A.F.; Vottis, C.T.; Megaloikonomos, P.D.; Agrogiannis, G.D.; Theocharis, S. Neovascularization in Ewing's sarcoma. *Neoplasma* **2018**, *65*, 317–325. [[CrossRef](#)]
136. Chen, D.; Zhang, Y.-J.; Zhu, K.; Wang, W.-C. A systematic review of vascular endothelial growth factor expression as a biomarker of prognosis in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol.* **2013**, *34*, 1895–1899. [[CrossRef](#)]
137. Yang, J.; Yang, D.; Sun, Y.; Sun, B.; Wang, G.; Trent, J.C.; Araujo, D.M.; Chen, K.; Zhang, W. Genetic amplification of the vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway genes, including VEGFA, in human osteosarcoma. *Cancer* **2011**, *117*, 4925–4938. [[CrossRef](#)]
138. Fuchs, B.; Inwards, C.Y.; Janknecht, R. Vascular endothelial growth factor expression is up-regulated by EWS-ETS oncoproteins and Sp1 and may represent an independent predictor of survival in Ewing's sarcoma. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 1344–1353. [[CrossRef](#)]
139. Van der Schaft, D.W.J.; Hillen, F.; Pauwels, P.; Kirschmann, D.A.; Castermans, K.; Egbrink, M.G.A.O.; Tran, M.G.B.; Sciot, R.; Hauben, E.; Hogendoorn, P.C.W.; et al. Tumor cell plasticity in Ewing sarcoma, an alternative circulatory system stimulated by hypoxia. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 11520–11528. [[CrossRef](#)]
140. Reddy, K.; Zhou, Z.; Schadler, K.; Jia, S.-F.; Kleinerman, E.S. Bone marrow subsets differentiate into endothelial cells and pericytes contributing to Ewing's tumor vessels. *Mol. Cancer Res.* **2008**, *6*, 929–936. [[CrossRef](#)]

141. Reddy, K.; Cao, Y.; Zhou, Z.; Yu, L.; Jia, S.-F.; Kleinerman, E.S. VEGF165 expression in the tumor microenvironment influences the differentiation of bone marrow-derived pericytes that contribute to the Ewing's sarcoma vasculature. *Angiogenesis* **2008**, *11*, 257–267. [[CrossRef](#)]
142. Easwaran, V.; Lee, S.H.; Inge, L.; Guo, L.; Goldbeck, C.; Garrett, E.; Wiesmann, M.; Garcia, P.D.; Fuller, J.H.; Chan, V.; et al. beta-Catenin regulates vascular endothelial growth factor expression in colon cancer. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 3145–3153.
143. Zhang, X.; Gaspard, J.P.; Chung, D.C. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6050–6054.
144. Kawano, Y.; Kypta, R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 2627–2634. [[CrossRef](#)]
145. Dufourcq, P.; Leroux, L.; Ezan, J.; Descamps, B.; Lamazière, J.-M.D.; Costet, P.; Basoni, C.; Moreau, C.; Deutsch, U.; Couffignal, T.; et al. Regulation of endothelial cell cytoskeletal reorganization by a secreted frizzled-related protein-1 and frizzled 4- and frizzled 7-dependent pathway: Role in neovessel formation. *Am. J. Pathol.* **2008**, *172*, 37–49. [[CrossRef](#)]
146. Duplâa, C.; Jaspard, B.; Moreau, C.; D'Amore, P.A. Identification and cloning of a secreted protein related to the cysteine-rich domain of frizzled. Evidence for a role in endothelial cell growth control. *Circ. Res.* **1999**, *84*, 1433–1445. [[CrossRef](#)]
147. Muley, A.; Majumder, S.; Kolluru, G.K.; Parkinson, S.; Viola, H.; Hool, L.; Arfuso, F.; Ganss, R.; Dharmarajan, A.; Chatterjee, S. Secreted frizzled-related protein 4: An angiogenesis inhibitor. *Am. J. Pathol.* **2010**, *176*, 1505–1516. [[CrossRef](#)]
148. Zhao, S.; Kurenbekova, L.; Gao, Y.; Roos, A.; Creighton, C.J.; Rao, P.; Hicks, J.; Man, T.-K.; Lau, C.; Brown, A.M.C.; et al. NKD2, a negative regulator of Wnt signaling, suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *Oncogene* **2015**, *34*, 5069. [[CrossRef](#)]
149. Liao, D.; Johnson, R.S. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26*, 281–290. [[CrossRef](#)]
150. Forsythe, J.A.; Jiang, B.H.; Iyer, N.V.; Agani, F.; Leung, S.W.; Koos, R.D.; Semenza, G.L. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 4604–4613. [[CrossRef](#)]
151. Krock, B.L.; Skuli, N.; Simon, M.C. Hypoxia-induced angiogenesis: Good and evil. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 1117–1133. [[CrossRef](#)]
152. Zeng, W.; Wan, R.; Zheng, Y.; Singh, S.R.; Wei, Y. Hypoxia, stem cells and bone tumor. *Cancer Lett.* **2011**, *313*, 129–136. [[CrossRef](#)]
153. Zhang, X.-D.; Wu, Q.; Yang, S.-H. Effects of siRNA-mediated HIF-1 α gene silencing on angiogenesis in osteosarcoma. *Pak. J. Med. Sci.* **2017**, *33*, 341–346. [[CrossRef](#)]
154. Aryee, D.N.T.; Niedan, S.; Kauer, M.; Schwentner, R.; Bennani-Baiti, I.M.; Ban, J.; Muehlbacher, K.; Kreppel, M.; Walker, R.L.; Meltzer, P.; et al. Hypoxia modulates EWS-FLI1 transcriptional signature and enhances the malignant properties of Ewing's sarcoma cells in vitro. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4015–4023. [[CrossRef](#)]
155. Zhang, D.; Cui, G.; Sun, C.; Lei, L.; Lei, L.; Williamson, R.A.; Wang, Y.; Zhang, J.; Chen, P.; Wang, A.; et al. Hypoxia promotes osteosarcoma cell proliferation and migration through enhancing platelet-derived growth factor-BB/platelet-derived growth factor receptor- β axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, *512*, 360–366. [[CrossRef](#)]
156. Zhang, B.; Li, Y.-L.; Zhao, J.-L.; Zhen, O.; Yu, C.; Yang, B.-H.; Yu, X.-R. Hypoxia-inducible factor-1 promotes cancer progression through activating AKT/Cyclin D1 signaling pathway in osteosarcoma. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 1–9. [[CrossRef](#)]
157. Li, Y.; Zhang, W.; Li, S.; Tu, C. Prognosis value of Hypoxia-inducible factor-1 α expression in patients with bone and soft tissue sarcoma: A meta-analysis. *Springerplus* **2016**, *5*, 1370. [[CrossRef](#)]
158. Wang, S.; Ren, T.; Huang, Y.; Bao, X.; Sun, K.; Shen, D.; Guo, W. BMP2 and HIF1- α overexpression in resected osteosarcoma correlates with distant metastasis and patient survival. *Chin. J. Cancer Res.* **2017**, *29*, 447–454. [[CrossRef](#)]
159. Ren, H.-Y.; Zhang, Y.-H.; Li, H.-Y.; Xie, T.; Sun, L.-L.; Zhu, T.; Wang, S.-D.; Ye, Z.-M. Prognostic role of hypoxia-inducible factor-1 alpha expression in osteosarcoma: A meta-analysis. *Onco Targets Ther.* **2016**, *9*, 1477–1487. [[CrossRef](#)]

160. Demir, R.; Dimmler, A.; Naschberger, E.; Demir, I.; Papadopoulos, T.; Melling, N.; Sturzl, M.; Hohenberger, W. Malignant progression of invasive tumour cells seen in hypoxia present an accumulation of beta-catenin in the nucleus at the tumour front. *Exp. Mol. Pathol.* **2009**, *87*, 109–116. [[CrossRef](#)]
161. Kaidi, A.; Williams, A.C.; Paraskeva, C. Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 210–217. [[CrossRef](#)]
162. Scholten, D.J.; Timmer, C.M.; Peacock, J.D.; Pelle, D.W.; Williams, B.O.; Steensma, M.R. Down regulation of Wnt signaling mitigates hypoxia-induced chemoresistance in human osteosarcoma cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e111431. [[CrossRef](#)]
163. Casey, D.L.; Lin, T.-Y.; Cheung, N.-K.V. Exploiting Signaling Pathways and Immune Targets Beyond the Standard of Care for Ewing Sarcoma. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 537. [[CrossRef](#)]
164. Qian, B.-Z.; Pollard, J.W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **2010**, *141*, 39–51. [[CrossRef](#)]
165. Yang, Y.; Ye, Y.-C.; Chen, Y.; Zhao, J.-L.; Gao, C.-C.; Han, H.; Liu, W.-C.; Qin, H.-Y. Crosstalk between hepatic tumor cells and macrophages via Wnt/ β -catenin signaling promotes M2-like macrophage polarization and reinforces tumor malignant behaviors. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 793. [[CrossRef](#)]
166. Liu, T.; Fang, X.-C.; Ding, Z.; Sun, Z.-G.; Sun, L.-M.; Wang, Y.-L. Pre-operative lymphocyte-to-monocyte ratio as a predictor of overall survival in patients suffering from osteosarcoma. *FEBS Open Bio* **2015**, *5*, 682–687. [[CrossRef](#)]
167. Assal, A.; Kaner, J.; Pendurti, G.; Zang, X. Emerging targets in cancer immunotherapy: Beyond CTLA-4 and PD-1. *Immunotherapy* **2015**, *7*, 1169–1186. [[CrossRef](#)]
168. Koirala, P.; Roth, M.E.; Gill, J.; Chinai, J.M.; Ewart, M.R.; Piperdi, S.; Geller, D.S.; Hoang, B.H.; Fatakhova, Y.V.; Ghorpade, M.; et al. HHLA2, a member of the B7 family, is expressed in human osteosarcoma and is associated with metastases and worse survival. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31154. [[CrossRef](#)]
169. Koirala, P.; Roth, M.E.; Gill, J.; Piperdi, S.; Chinai, J.M.; Geller, D.S.; Hoang, B.H.; Park, A.; Fremed, M.A.; Zang, X.; et al. Immune infiltration and PD-L1 expression in the tumor microenvironment are prognostic in osteosarcoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 30093. [[CrossRef](#)]
170. Spurny, C.; Kailayangiri, S.; Jamitzky, S.; Altvater, B.; Wardelmann, E.; Dirksen, U.; Hardes, J.; Hartmann, W.; Rossig, C. Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression is not a predominant feature in Ewing sarcomas. *Pediatr. Blood Cancer* **2018**, *65*, e26719. [[CrossRef](#)]
171. McCaughan, G.J.B.; Fulham, M.J.; Mahar, A.; Soper, J.; Hong, A.M.; Stalley, P.D.; Tattersall, M.H.N.; Bhadri, V.A. Programmed cell death-1 blockade in recurrent disseminated Ewing sarcoma. *J. Hematol. Oncol.* **2016**, *9*, 48. [[CrossRef](#)]
172. Wang, L.; Zhang, Q.; Chen, W.; Shan, B.; Ding, Y.; Zhang, G.; Cao, N.; Liu, L.; Zhang, Y. B7-H3 is overexpressed in patients suffering osteosarcoma and associated with tumor aggressiveness and metastasis. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e70689. [[CrossRef](#)]
173. Yin, S.J.; Wang, W.J.; Zhang, J.Y. Expression of B7-H3 in cancer tissue during osteosarcoma progression in nude mice. *Genet. Mol. Res.* **2015**, *14*, 14253–14261. [[CrossRef](#)]
174. Goldsberry, W.N.; Londoño, A.; Randall, T.D.; Norian, L.A.; Arend, R.C. A Review of the Role of Wnt in Cancer Immunomodulation. *Cancers* **2019**, *11*, 771. [[CrossRef](#)]
175. Luke, J.J.; Bao, R.; Sweis, R.F.; Spranger, S.; Gajewski, T.F. WNT/ β -catenin Pathway Activation Correlates with Immune Exclusion across Human Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3074–3083. [[CrossRef](#)]
176. Spranger, S.; Bao, R.; Gajewski, T.F. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* **2015**, *523*, 231–235. [[CrossRef](#)]
177. De Ruiz Galarreta, M.; Bresnahan, E.; Molina-Sanchez, P.; Lindblad, K.E.; Maier, B.; Sia, D.; Puigvehi, M.; Miguela, V.; Casanova-Acebes, M.; Dhainaut, M.; et al. β -catenin activation promotes immune escape and resistance to anti-PD-1 therapy in hepatocellular carcinoma. *Cancer Discov.* **2019**. [[CrossRef](#)]
178. Dhupkar, P.; Gordon, N.; Stewart, J.; Kleinerman, E.S. Anti-PD-1 therapy redirects macrophages from an M2 to an M1 phenotype inducing regression of OS lung metastases. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 2654–2664. [[CrossRef](#)]
179. Galluzzi, L.; Spranger, S.; Fuchs, E.; López-Soto, A. WNT Signaling in Cancer Immunosurveillance. *Trends Cell Biol.* **2019**, *29*, 44–65. [[CrossRef](#)]



Connexin43 intercellular communication drives the early differentiation of human bone marrow stromal cells into osteoblasts

Julie Talbot¹ | Régis Brion^{1,2,3,4} | Audrey Lamora^{1,2,3,4} | Mathilde Mullard^{1,2,3} | Sarah Morice^{1,2,3} | Dominique Heymann^{1,4,5} | Franck Verrecchia^{1,2,3} 

¹INSERM, UMR 957, Nantes, France

²INSERM, UMR 1238, Nantes, France

³Université Bretagne Loire, Nantes, France

⁴CHU, Nantes, France

⁵Department of Oncology and metabolism, INSERM European Associated Laboratory, University of Sheffield, Sheffield, UK

Correspondence

Franck Verrecchia, INSERM UMR1238, Faculté de Médecine, 1 rue Gaston Veil, 44000 Nantes, France.

Email: franck.verrecchia@inserm.fr

Although it has been demonstrated that human bone marrow stromal cells (hBMSCs) express the ubiquitous connexin43 (Cx43) and form functional gap junctions, their role in the early differentiation of hBMSCs into osteoblasts remains poorly documented. Using in vitro assays, we show that Cx43 expression and gap junctional intercellular communication (GJIC) are increased during the differentiation of hBMSCs into osteoblasts, both at the protein and mRNA levels. Two independent procedures to reduce GJIC, a pharmacological approach with GJIC inhibitors (18 α -glycyrrhetic acid and Gap27 peptide) and a molecular approach using small interfering RNA against Cx43, demonstrated that the presence of Cx43 and functional junctional channels are essential to the ability of hBMSCs to differentiate into osteoblasts in vitro. In addition, a reduced GJIC decreases the expression of *Runx2*, the major transcription factor implicated in the control of osteoblast commitment and early differentiation of hBMSCs into osteoblasts, suggesting that GJIC mediated by Cx43 is implicated in this process. Together our results demonstrate that GJIC mediated by the Cx43 channels plays a central role throughout the differentiation of hBMSC into osteoblasts, from the early stages to the process of mineralization.

KEYWORDS

cell differentiation, connexin43, gap junction, human bone marrow stromal cells, intercellular communication, osteoblast

1 | INTRODUCTION

Bone formation is a regulated process that takes place during embryonic development, growth, remodeling, and repair. It begins with the commitment of mesenchymal stem cells (MSC) into the osteoblastic differentiation program, continues with the early differentiation of stem cells into osteoblast progenitors and the subsequent differentiation of these osteoblast progenitors into immature osteoblasts, and finally the late differentiation of these immature osteoblasts into mature osteoblasts (Augello & De Bari, 2010; Neve, Corrado, & Cantatore, 2011; Väänänen, 2005). These MSC, located mainly in the bone marrow stroma, can also differentiate into other mesenchymal cell lineages such as fibroblasts, chondrocytes, and bone marrow stromal cells including adipocytes, depending on the activated signaling transcription pathways (Friedenstein, Chailakhyan, & Gerasimov, 1987; Marie, 2008; Owen, 1988). At the end of the osteogenic

differentiation process, mature osteoblasts produce many markers such as alkaline phosphatase (ALP), collagen type I (COL1), bone sialoprotein (BSP), osteopontin, and osteocalcin (OCN) (Wennberg et al., 2000). This process results in the formation of an extracellular organic matrix which will be mineralized.

Connexins, the structural proteins of gap junctions, are a family of transmembrane proteins that oligomerize into hemichannels containing six connexin subunits (Sosinsky & Nicholson, 2005). Upon reaching the cell surface, two hemichannels pair to complete an intercellular gap junction channel, which directly links the cytoplasm of neighboring cells and mediates the exchange of low-molecular-mass molecules (<1,000 Da), including cAMP, inositol trisphosphate, and Ca²⁺ (Nielsen et al., 2012; Söhl & Willecke, 2004).

Multiple lines of evidence have established that Cx43, the most abundant connexin in bone cells, and subsequent intercellular channels play a major role in skeletal development and for the

function of osteoblasts (Plotkin & Stains, 2015; Stains & Civitelli, 2016). Cx43 gene mutations have thus been directly associated with abnormalities of skeletal development observed for example in oculodentodigital and craniofacial dysplasias (Laird, 2014; Paznekas et al., 2009). Specifically, it has been demonstrated that Cx43 expression is required for osteoblastic gene expression and function in primary and cultured osteoblasts (Lecanda et al., 1998, 2000). For example, it has been shown that gap junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture and for the stimulation of osteoblast mineralization in response to parathyroid hormone (Schiller, Mehta, Roos, & Howard, 1992; Schiller, D'Ippolito, Balkan, Roos, & Howard, 2001a; Schiller, D'Ippolito, Balkan, Roos, & Howard, 2001b). In addition, *in vivo* experiments using either Cx43^{-/-} or Cx43^{fl/-};Col1a.1-2.3 kb-Cre mice have demonstrated that Cx43 plays a crucial role in osteoblastic differentiation and function (Plotkin & Stains, 2015).

However, although it was shown that human MSC (hMSC) express Cx40, Cx43 and Cx45 (Talbot et al., 2013; Valiunas et al., 2004), and form functional gap junctions, the role of connexins in the *in vitro* differentiation of human MSCs into osteoblast progenitors remains poorly documented. In this context, the aim of the present work was to determine the specific role of Cx43 in the early differentiation of hMSCs into osteoblasts and throughout the process of osteoblast differentiation by using small interfering RNA against Cx43 as well as via a pharmacological approach with GJIC inhibitors (18 α -glycyrrhetic acid and Gap27 peptide).

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics statement

Bone marrow aspirates were obtained from healthy volunteers (age = 46 \pm 12; range = 36–67) during orthopaedic surgical procedures after exposure of the iliac crest in the orthopaedic department of the University Hospital of Tours (France). The written consent of informed patients was obtained for the use of tissue samples for anonymized research, in accordance with French law (Art. L. 1245–2 du code de la sant e publique, Loi n o 2004–800 du 6 ao ut 2004 Journal Officiel du 7 ao ut 2004). The donors had no significant medical history. The study followed the ethical guidelines of the University Hospital of Tours and was approved by the ethics committee "Comite de protection des personnes" (Tours–Region Centre Ouest).

2.2 | Cell culture

Human bone marrow stromal cells (hBMSCs) were isolated by Ficoll density gradient separation as previously described (Chang, Hsieh, & Chao, 2009). Non-adherent cells were removed by replacing the culture medium and hBMSCs were then cultured in medium composed of Dulbecco's Modified Eagle Medium (Lonza, Verviers, Belgium), 10% fetal bovine serum (Hyclone, GE Healthcare Life Sciences, Velizy Villacoublay, France) with 1 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; R&D systems, Lille, France). Adherent cells were characterized by flow cytometry (CD45⁻, CD34⁻, CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, and

CD146⁺, purity \geq 99%) prior to further experiments. The expression of each marker was not changed in the presence of bFGF.

2.3 | Osteoblast differentiation

hBMSCs were seeded at 1×10^4 cells/cm² in 24-well plates in culture medium without bFGF. After 3 days, when the cells were confluent, the medium was replaced by fresh medium supplemented with vitamin D3 (10⁻⁸ M; Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland) and dexamethasone (10⁻⁸ M; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), referred to as "osteogenic medium" in the text. Three days later, ascorbic acid (50 μ g/ml; Sigma) and β -glycerophosphate (10⁻⁷ M; Sigma) was added to allow mineralization. Alizarin red staining was used to detect the mineralized nodules formed, as previously described (Chipoy et al., 2004). Briefly, around day 15, cells were fixed in ice-cold 70% ethanol for 1 hr and incubated with Alizarin red S (40 mM, pH 7.4; Sigma) for 10 min at room temperature. After washing, images were captured using a stereo microscope (Stemi 2000-C; Zeiss, Oberkochen, Germany), and mineralized surfaces were quantified using the Qwin software (Leica, Wetzlar, Germany). This software quantifies the red pixel intensity of the whole well surface and expresses these values in arbitrary units. Two gap junction inhibitors were used: the Cx43 mimetic peptide Gap27 (250 μ M; GeneCust, Ellange, Luxembourg) and the chemical agent 18 α -glycyrrhetic acid (50 μ M; Sigma). Medium in presence or absence of GJIC inhibitors was replaced by fresh medium every 24 hr. Control cultures were treated with the solvent (DMSO, Sigma) only.

2.4 | Western Blot

Cells were lysed in a lysis buffer (1% SDS, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM Sodium orthovanadate) and protein concentration was determined by BCA kit (Sigma). A 10 μ g of total protein extracts in Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue) were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore, Saint Quentin en Yveline, France). Membranes were immunoblotted with mouse monoclonal anti-connexin43 (dilution 1/1,000, Sigma) or mouse monoclonal anti-GAPDH (dilution 1/2,000, Abcam, Paris, France). Antibody binding was visualized with the enhanced chemiluminescence system (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific, Courtaboeuf, France). For quantification, luminescence was detected with a Charge Couple Device (CCD) camera and analyzed using the GeneTools program (Syngene, Cambridge, UK).

2.5 | Real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted using NucleoSpin®RNAII (Macherey Nagel, Hoerd, France). A 1 μ g of total RNA was used for first strand cDNA synthesis using ThermoScript RT-PCR System (Invitrogen, Courtaboeuf, France). DNase I treatment (25 units, 10 min) of total RNA was performed to eliminate genomic contamination. Real-time PCR was performed with a Chromo4 instrument (Biorad, Marne la Coquette, France) using SYBR Green Supermix reagents (Biorad). Primer sequences are provided in Table 1. Calibration curves with different

TABLE 1 Primer sequence for quantitative RT-PCR

Gene	Gene (full name)	Accession number	Forward primer	Reverse primer
Cx43	Connexin43	NM_000165.3	gcctgaacttgcttttcat	ctccagtcacccatgttgc
OCN	Osteocalcin	NM_199173.2	ggcgctacctgtatcaatgg	tcagccaactcgtcacagtc
BSP	Bone sialoprotein	NM_004967	cgaatacacggcgctcaatg	gtagctgtactcatcttcatagggc
ALP	Alkaline phosphatase	NM_000478.3	aacaccaccagggaac	ggtcacaatcccacagatt
Runx2	Runt-related transcription factor 2	NM_004348.3	gcctaggcgcttccaga	gctcttctactgagagtgaagg
SOX9	SRY (sex determining region Y)-box9	NM_000346.3	gtaccgcacttgcaaac	tcgctctcgttcagaagtctc
Cx45	Connexin 45	NM_005497.3	tggtaaccgaagtctggaca	gaacagtgagccagatcttccc
Hprt 1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	NM_000194.1	tgaccttgattatttgcatacc	cgagcaagcgttcagctct
Cyc1	Cytochrome c-1	NM_001916	gcattggtgaggactacg	ggccaggaagtaggggttg

amounts of cDNA were used to validate the primers according the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). Cyc1 (cytochrome c-1) and Hprt 1 (Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1) were used as internal controls to normalize the data to determine the relative expression of the target genes using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

2.6 | Plasmid constructs, transient cell transfections, and reporter assays

The Cx43 promoter/gene reporter construct -2400Cx43-lux was a gift from GI Fishman, The Leon H. Charney Division of Cardiology, New York University School of Medicine, New York, NY and has been described previously (De Leon et al., 1994). Transient cell transfections were performed with jetPEI™ (Polyplus-transfection, Strasbourg, France). The phRLMPLP-Renilla luciferase expression vector was cotransfected in every experiment to monitor transfection efficiencies. Luciferase activity was determined with the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega, Charbonnières, France).

2.7 | RNA interference

Modified hBMSCs cells were obtained by lentiviral cell transduction as previously described (Trichet et al., 2006). Oligonucleotides were designed and cloned into pSUPER to produce the short hairpin RNA shRNACx43 directed against the human Cx43 gene. The targeted sequence was TGCTGCGAACCCTACATCAT. The cloned oligonucleotides were controlled by sequencing (Genome Express) before subcloning them with the upstream H1 promoter into the vector pFG12. As a control, a vector pFG12 was developed to produce shRNAs targeting the LacZ gene. The resulting constructs were used for lentivirus production following the protocols provided with the ViraPower Lentiviral Expression System (Invitrogen) to transduce hBMSCs.

2.8 | Parachute assay

Gap junctional intercellular communication (GJIC) was determined by "parachute" assay, as previously described (Talbot et al., 2013; Tellez-Gabriel et al., 2017; Ziambaras, Lecanda, Steinberg, & Civitelli, 1998). Cell cultures were divided into "acceptor" and "donor" cell groups. Adherent acceptor cells were loaded with Dil (Sigma; 5 μ M), a nontransferable membrane dye, for 1 hr, and confluent donor cells

were dyed with calcein-acetoxymethylester (calcein-AM; Sigma; 1 μ M), a gap junction permeant dye, for 45 min. After loading, cells were washed in PBS to remove the excess dye. Then, the calcein-AM-dyed cells were trypsinized and parachuted on the Dil-dyed acceptor cell layer at a cell ratio of 1:10 and incubated at 37°C for 2 hr to allow calcein transfer via gap junctions. Dye coupling was analyzed using a FACS FC500 cytometer (Beckmann Coulter, Villepinte, France). For the analysis of results, gates were established on the day of each experiment using non-dyed cells, cells dyed with calcein-AM, and cells dyed with Dil.

2.9 | Cell proliferation assay (test XTT)

Cell viability was determined using a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) reagent assay kit (Roche Molecular Biomedicals, Penzberg, Germany). Two thousand cells per well were plated into 96-well plates. At confluence, cells were cultured for 17 days in culture medium in the presence or absence of GJIC inhibitors.

2.10 | Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software (GraphPad Software). The unpaired *t*-test was used for the comparison of two conditions. An ANOVA test was used for the multi-group comparisons of more than two samples. A two-way ANOVA test was used for multi-group comparisons of data that compare two variables. The results are given as mean \pm SD. Results with *p* < 0.05 were considered significant.

3 | RESULTS

3.1 | Increased production of Cx43 during the differentiation of hBMSCs into osteoblasts in vitro

We first analyzed the in vitro differentiation of hBMSC into osteoblasts under our experimental conditions (see materials and methods). As shown in Figure 1a, incubation of hBMSCs in monolayer cultures with osteogenic medium over 2 weeks resulted in osteoblastic differentiation process as demonstrated by a marked increase in mineral deposition revealed by Alizarin red staining.

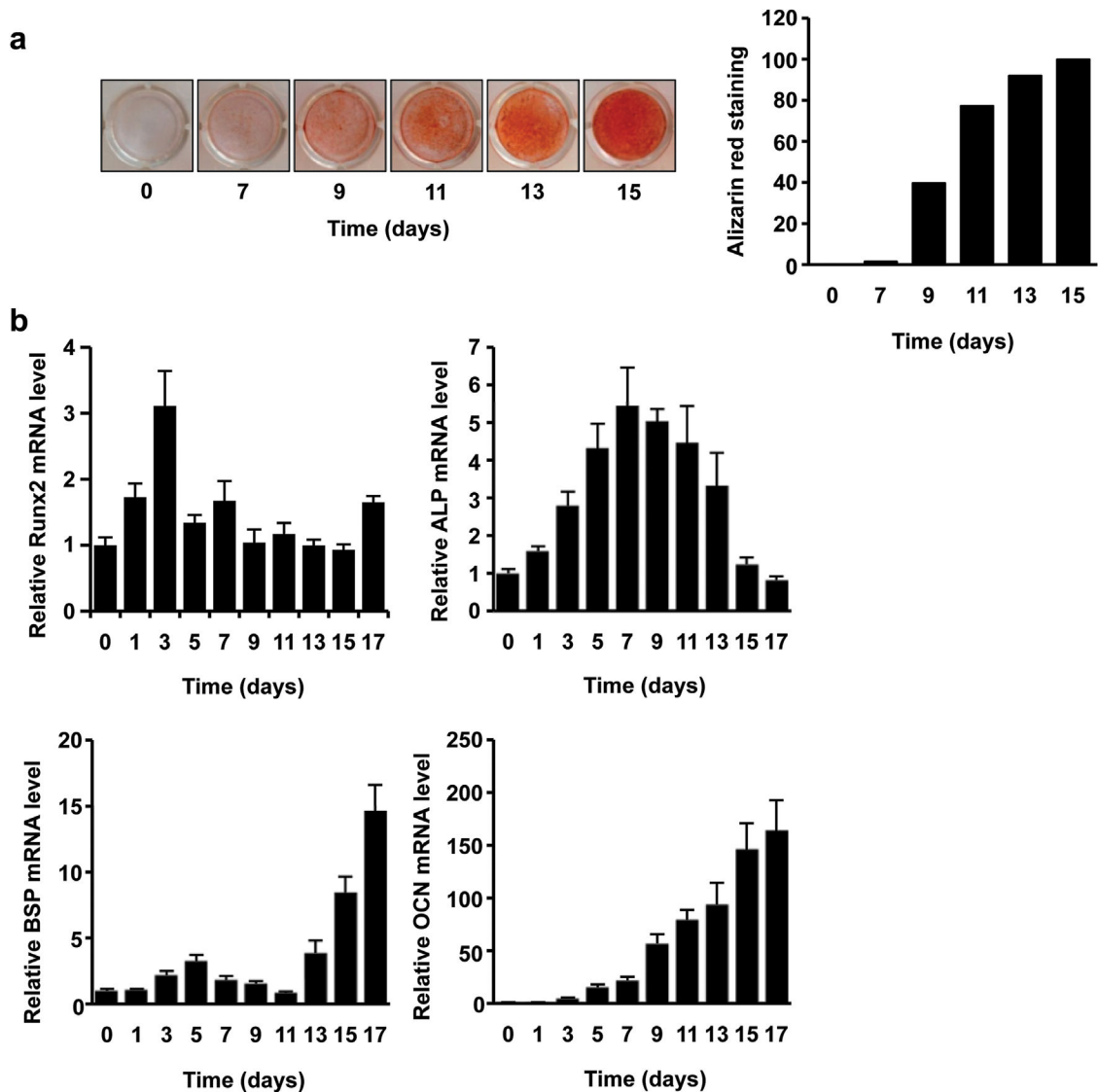


FIGURE 1 In vitro differentiation of hBMSCs toward osteoblasts. hBMSCs were cultured in the presence or absence of osteogenic medium up to 17 days. (a) At each time point, cultures were fixed and stained with Alizarin red S. Results show one representative experiment of three independent experiments. (b) *Runx2*, *Alkaline Phosphatase* (ALP), *Bone Sialoprotein* (BSP), and *Osteocalcin* (OCN) mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR, and are expressed relative to the control culture in absence of osteogenic medium. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate

Concurrently, there was an increase in the expression of genes associated with osteoblast differentiation (Figure 1b). The expression of *Runx2*, the main transcriptional factor involved in the osteoblast commitment and the early differentiation of hBMSCs into osteoblast progenitors (Marie, 2008), was increased quickly after stimulation of hBMSCs with osteogenic medium. Indeed, quantitative real-time PCR demonstrated that *Runx2* mRNA levels increased from day 1 until day 3 and then decreased. Quantitative real-time PCR demonstrated that the levels of transcripts encoding *Alkaline Phosphatase* (ALP), a gene associated with the differentiation of osteoblast progenitors into immature osteoblasts, increased from days 3 to 7, and then slowly returned to basal level. The transcript levels of *Bone Sialoprotein* (BSP) and *Osteocalcin* (OCN), two genes associated with the late differentiation of immature osteoblasts into mature osteoblasts, gradually increased starting at day 13 and day 7,

respectively, until the end of the experiment. As expected, the expression of *Sox9*, a transcription factor implicated in chondrocyte differentiation was not modified after stimulation of hBMSCs with osteogenic medium (data not shown).

We secondly analyzed the production of Cx43 during hBMSC differentiation into osteoblasts under our experimental conditions. Interestingly, Western-Blot analysis showed an increase in Cx43 protein level after treatment of hBMSCs with osteogenic medium for 9 days, which remained stable until day 15 (Figure 2a). To determine whether the induction of Cx43 production during hBMSC differentiation occurred via modulation of the corresponding gene, the Cx43 mRNA steady-state levels following treatment with osteogenic medium were measured by real-time PCR. As shown in Figure 2b, induction of Cx43 mRNA was observed in response to osteogenic medium after 9 days of treatment, and Cx43 levels

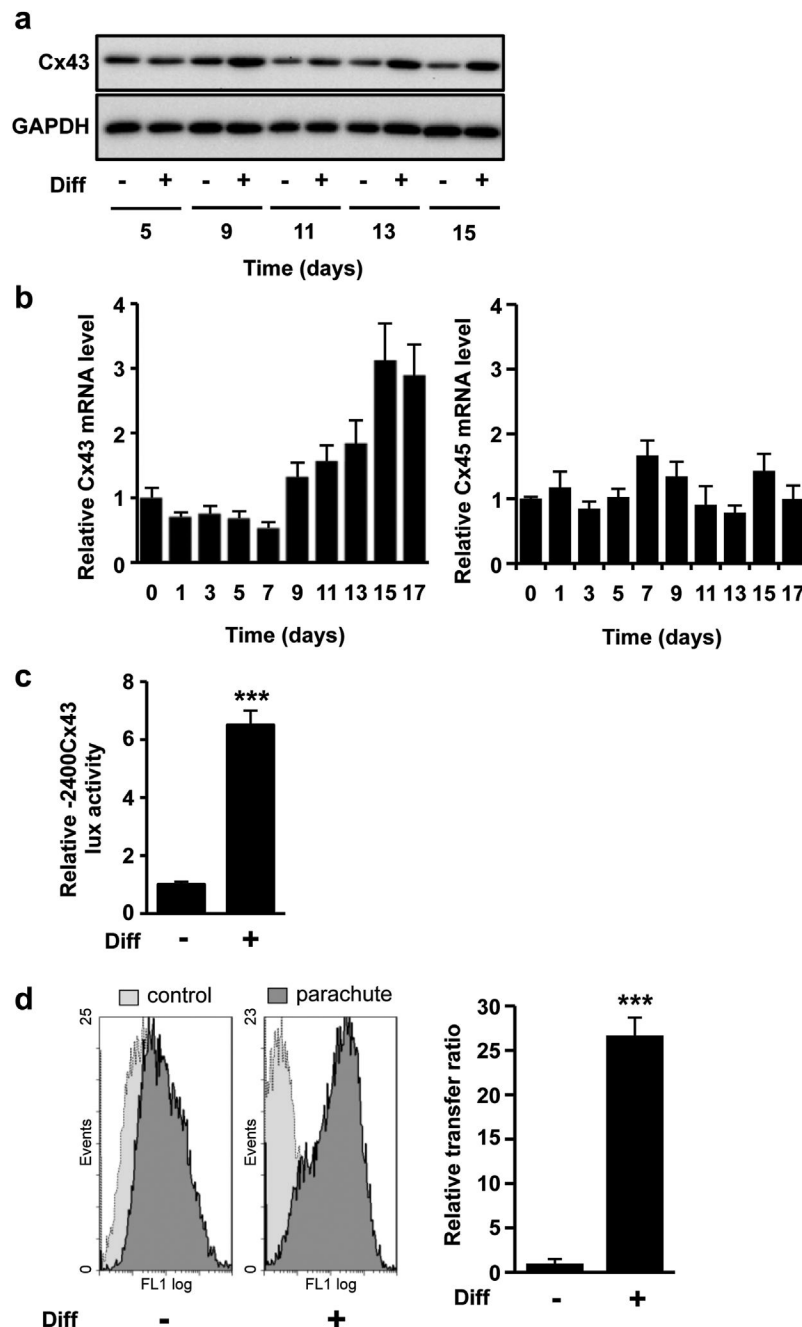


FIGURE 2 Increase of Cx43 production during the differentiation of hBMSCs into osteoblasts. hBMSCs were cultured in the presence or absence of osteogenic medium (Diff) up to 17 days. (a) Cx43 production was detected by Western Blot analysis. Result shown is representative of three independent experiments. (b) Cx43 and Cx45 mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR, and expressed relative to the control culture in absence of osteogenic medium. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. (c) hBMSC cells were incubated in the presence or absence of osteogenic medium for 9 days. After incubation, cell cultures were transfected with the -2400Cx43-lux construct, and incubation continued for another 48 hr. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate ($***p < 0.01$). (d) FACS analysis of calcein transfer in hBMSCs treated or not with osteogenic medium during 17 days. Histogram plots (left panel) represent the mean of fluorescence recorded in FL1 channel, which corresponds to calcein-positive cells. Control peak corresponds to cells dyed with Dil only, and parachute peak to cells double-labeled. Histograms (right panel) indicate mean of the relative transfer-ratio of calcein between cells, which represents a direct measure of the degree of dye coupling. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate ($***p < 0.01$)

remained elevated until day 17. By contrast, no change in the expression of Cx45 was observed during this process of hBMSC differentiation (Figure 2b). Although the presence of Cx40 has been demonstrated in hMSC (Valiunas et al., 2004), its expression level

remains very low (under the limit of capacity of detection by PCR in our experimental conditions) throughout the differentiation process (data not shown). To further explore whether the effect of osteogenic medium on Cx43 gene expression takes place at the

transcriptional level, transient cell transfections were performed with the Cx43 promoter/gene reporter construct -2400Cx43-lux. As shown in Figure 2c, osteogenic medium induced a 6.5-fold transactivation of the Cx43 promoter in hBMSCs. To determine whether the increase in Cx43 gene expression in hBMSCs during osteogenic differentiation is associated with gap junctional intercellular communication changes, GJIC was analyzed by FACS using the parachute assay. GJIC was significantly enhanced (26-fold increase) after 17 days of incubation of hBMSCs with osteogenic medium (Figure 2d).

Together, these results demonstrated an increase in Cx43 production and subsequent cell-cell communication during the differentiation of hBMSCs into osteoblasts.

3.2 | Small interfering RNA against Cx43 and treatment with 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide efficiently reduce GJIC between hBMSCs

To investigate the role of Cx43 and GJIC during the early differentiation of hBMSCs into osteoblast progenitors and throughout the process of hBMSC differentiation into mature osteoblasts, Cx43 was stably knocked down in hBMSCs by transduction with a lentiviral vector or the cells were treated with the GJIC inhibitor 18 α -glycyrrhetic acid or with the peptide Gap27.

As shown in Figure 3a, shCx43 cells were characterized by a significant (70%) reduction in Cx43 mRNA levels compared to shLacZ or parental cells used as control. This decrease was confirmed at the protein level (Figure 3b). The knocked down of Cx43 does not change the Cx45 gene expression in hBMSCs (Figure 3a). In addition, GJIC analysis using the parachute assay demonstrated that GJIC was significantly decreased (by 50%) in shCx43 cells compared to shLacZ cells or parental hBMSCs (Figure 3c). Of note, the Cx43 knock-down does not affect the proliferation rate of the cells (data not shown). As shown in Figure 3d both, 18 α -glycyrrhetic (50 μ M) acid and Gap27 peptide (250 μ M) significantly reduce GJIC between hBMSCs by, respectively, 70% and 60% after 24 hr incubation of the cells. Of note, in the experimental conditions used, the viability of cells was not affected in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide throughout the experiment (Figure 3e).

Together these results demonstrated that small interfering RNA against Cx43 or treatment with two GJIC inhibitors efficiently reduce GJIC between hBMSCs.

3.3 | Cx43 knocked down blocks the differentiation of hBMSCs into osteoblasts

We next investigated the effect of the Cx43 knocked down on the osteogenic differentiation of hBMSCs. As shown in Figure 4a, an early decrease in *Runx2* expression was observed in shCx43 cells in response to osteogenic medium compared to that measured in shLacZ cells or in parental cells. Indeed, *Runx2* mRNA steady-state levels were increased by approximately threefold in parental and shLacZ cells after treatment of hBMSCs with osteogenic medium for

1 day, but only by 1.7-fold in shCx43 cells. Furthermore, a significant decrease in *ALP*, *BSP*, and *OCN* expression levels was observed in shCx43 cells in response to osteogenic medium compared to those measured in shLacZ or in parental cells. *ALP* mRNA steady-state levels were increased by approximately ninefold in parental and shLacZ cells, but only by twofold in shCx43 cells after 7 days of incubation with osteogenic medium (Figure 4a). *OCN* and *BSP* mRNA steady-state levels were increased by approximately 180- and 16-fold, respectively, in parental and shLacZ cells, and only by 120- and 8-fold in shCx43 cells after treatment of hBMSCs with osteogenic medium for 17 days (Figure 4a). Interestingly, after 17 days of treatment with osteogenic medium, a marked decrease (60%) in mineral deposition was measured in shCx43 monolayer cultures compared to that measured in shLacZ or in parental cultures (Figure 4b). Finally, the expression level of Cx45 was evaluated by quantitative real-time PCR throughout the process of differentiation. As shown in Figure 4c, the expression level of Cx45 is not modified by the knocked down of Cx43 in hBMSC and remains unchanged throughout the process of differentiation. In contrast and as expected, the expression level of Cx43 was decreased after hBMSC infection with the shRNA against Cx43 and remains very low throughout the process of differentiation.

Together, these results indicate a crucial role of Cx43 during the early differentiation of hBMSCs into osteoblasts and throughout the process of osteoblast differentiation.

3.4 | Treatment with GJIC inhibitors inhibits the differentiation of hBMSCs into osteoblasts

To investigate the role GJIC, and not only the role of Cx43 expression, during the early differentiation of hBMSCs into osteoblast progenitors and throughout the process of hBMSC differentiation into mature osteoblasts, the cells were treated with 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide.

As shown in Figure 5a, a significant decrease in *Runx2* expression level in response to osteogenic medium was observed in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide compared to hBMSCs cultured without inhibitor. Treatment of hBMSCs with osteogenic medium for 1 day induced a 3.6-fold increase in *Runx2* mRNA steady-state levels. By contrast, *Runx2* level increased by only 1.4- and 1.6-fold in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide. A significant decrease in *ALP*, *BSP* and *OCN* expression levels in response to osteogenic medium was also observed in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide compared to hBMSC controls (Figure 5a). *ALP* mRNA steady-state levels were increased by 8.6-fold in the absence of a GJIC inhibitor, while treatment with 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide induced only a 2.2- and 3.2-fold increase in mRNA levels, respectively, after 7 days of incubation of hBMSCs in osteogenic medium. Treatment of hBMSCs with osteogenic medium for 17 days induced an increase in *OCN* and *BSP* mRNA steady-state levels of 137- and 10-fold, respectively. By contrast, *OCN* and *BSP* levels increased by only 30- and 2.3-fold in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid, and by 63- and 4.7-fold in the presence of Gap27

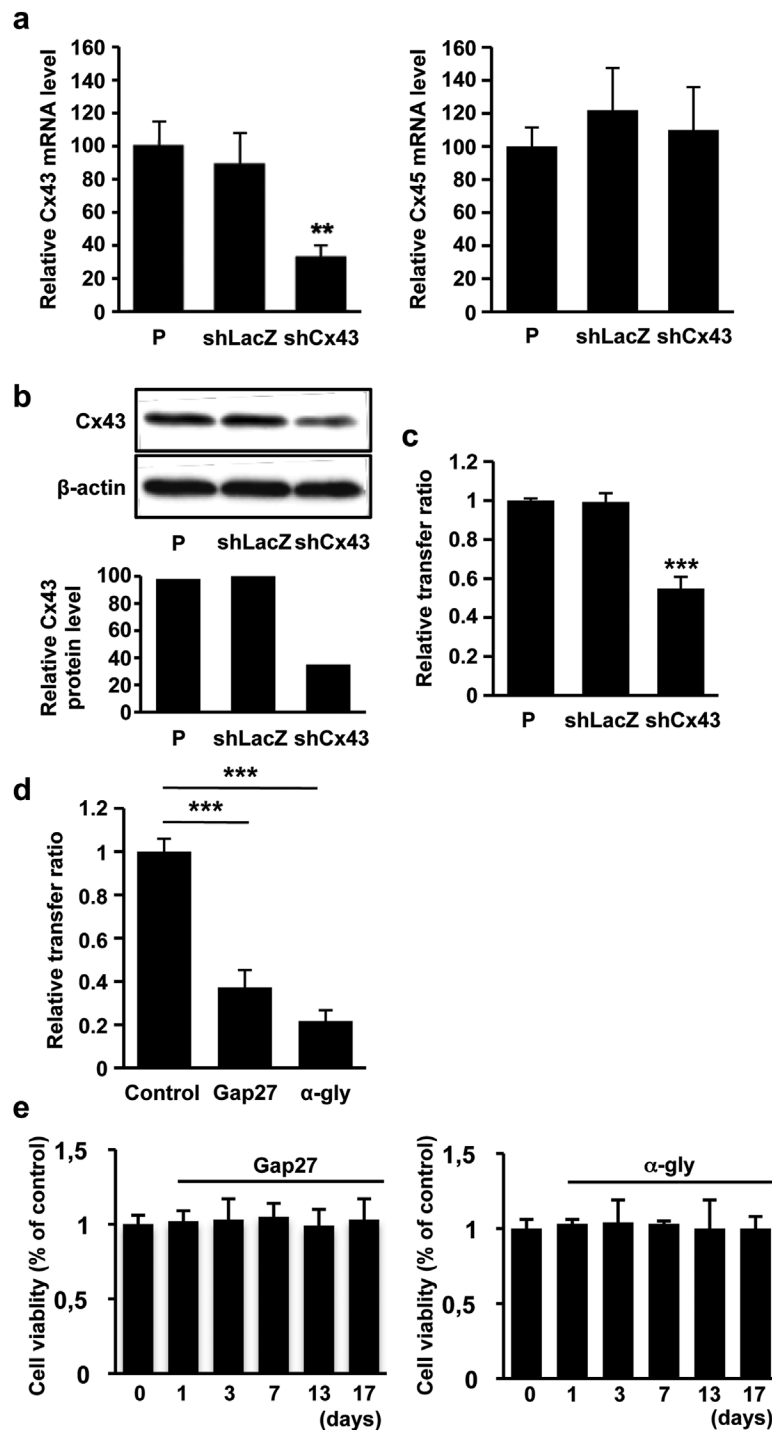


FIGURE 3 Small interfering RNA against Cx43 and GJIC inhibitors efficiency block GJIC in hBMSCs. (a) Cx43 and Cx45 mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR in parental (P), shLacZ, and shCx43 cells as indicated. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (** $p < 0.05$). (b) Cx43 production was detected by Western Blot analysis in parental, shLacZ and shCx43 cells as indicated. Result shown is representative of three independent experiments. (c) FACS analysis of calcein transfer in parental, shLacZ and shCx43 hBMSCs. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (** $p < 0.01$). (d) FACS analysis of calcein transfer in hBMSCs treated or not with 18 α -glycyrrhetic acid (50 μ M) or Gap27 peptide (250 μ M) for 24 hr. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (** $p < 0.01$). (e) hBMSCs viability, treated or not with 18 α -glycyrrhetic acid (50 μ M) or Gap27 peptide (250 μ M), was determined using a 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) reagent assay kit. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate

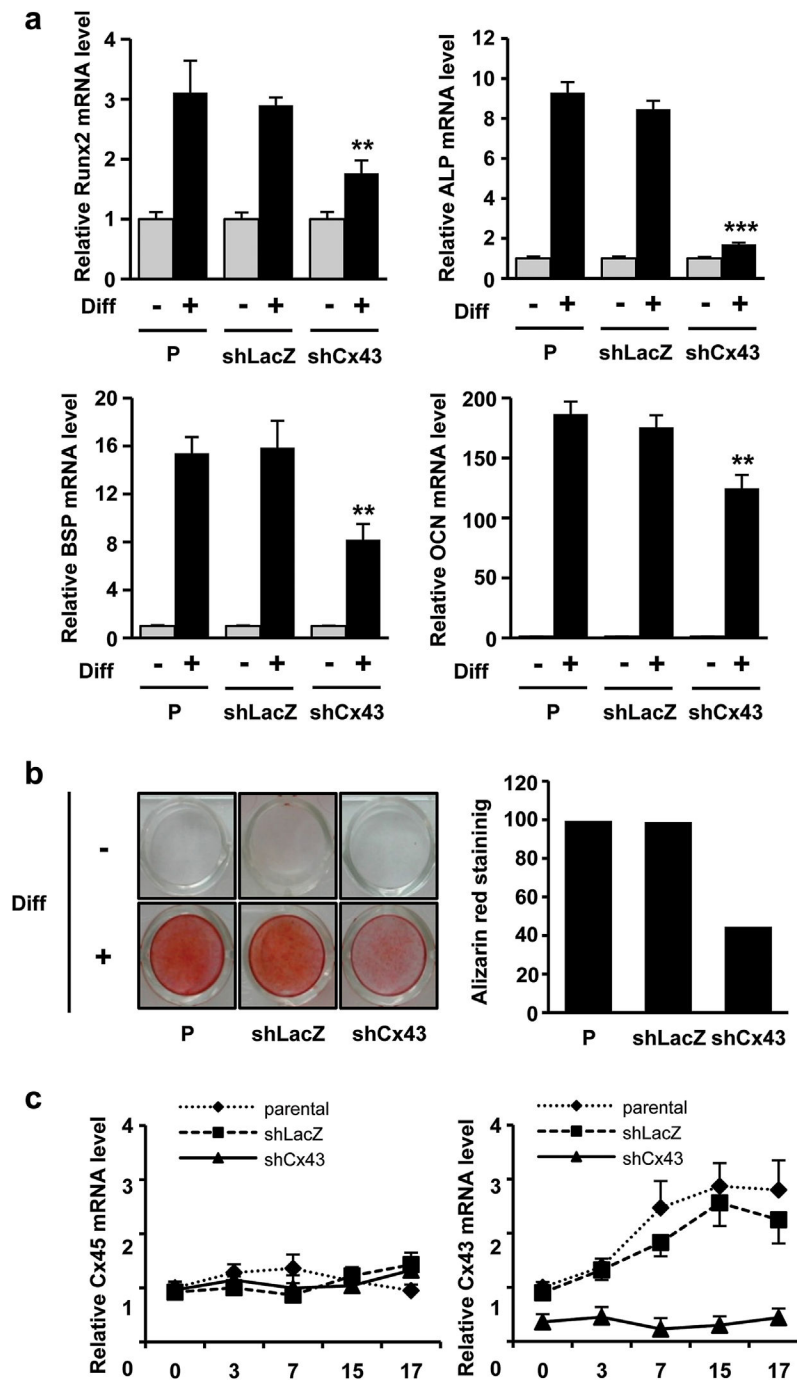


FIGURE 4 Small interfering RNA against Cx43 inhibits the differentiation of hBMSCs into osteoblasts. (a) Parental, shLacZ and shCx43 cells were cultured in the presence or absence of osteogenic medium. The expression of *Runx2* was determined by quantitative RT-PCR after incubation of hBMSCs with osteogenic medium for 1 day. The expression of ALP was determined by quantitative RT-PCR after incubation of hBMSCs with osteogenic medium for 7 days. The expression of *BSP* and *OCN* mRNA steady-state levels were measured by quantitative RT-PCR after incubation of hBMSCs with osteogenic medium for 17 day. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$). (b) Parental, shLacZ, and shCx43 hBMSCs were cultured in the presence or absence of osteogenic medium. Seventeen days after induction of osteogenesis, cultures were fixed, and stained with Alizarin red S. Results show one representative experiment of three independent experiments. (c) Parental, shLacZ, and shCx43 cells were cultured in the presence or absence of osteogenic medium. The expression of *Cx43* and *Cx45* were determined by quantitative RT-PCR throughout the differentiation process. Results indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate

peptide. In agreement with these data, a significant decrease in mineral deposition was measured in the presence of 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide compared to cells cultured in the absence of GJIC inhibitors. After 17 days of treatment with

osteogenic medium, hBMSCs treated with 18 α -glycyrrhetic acid or Gap27 peptide showed significantly less Alizarin red S staining (95% and 60%, respectively) compared to cells cultured without GJIC inhibitor (Figure 5b).

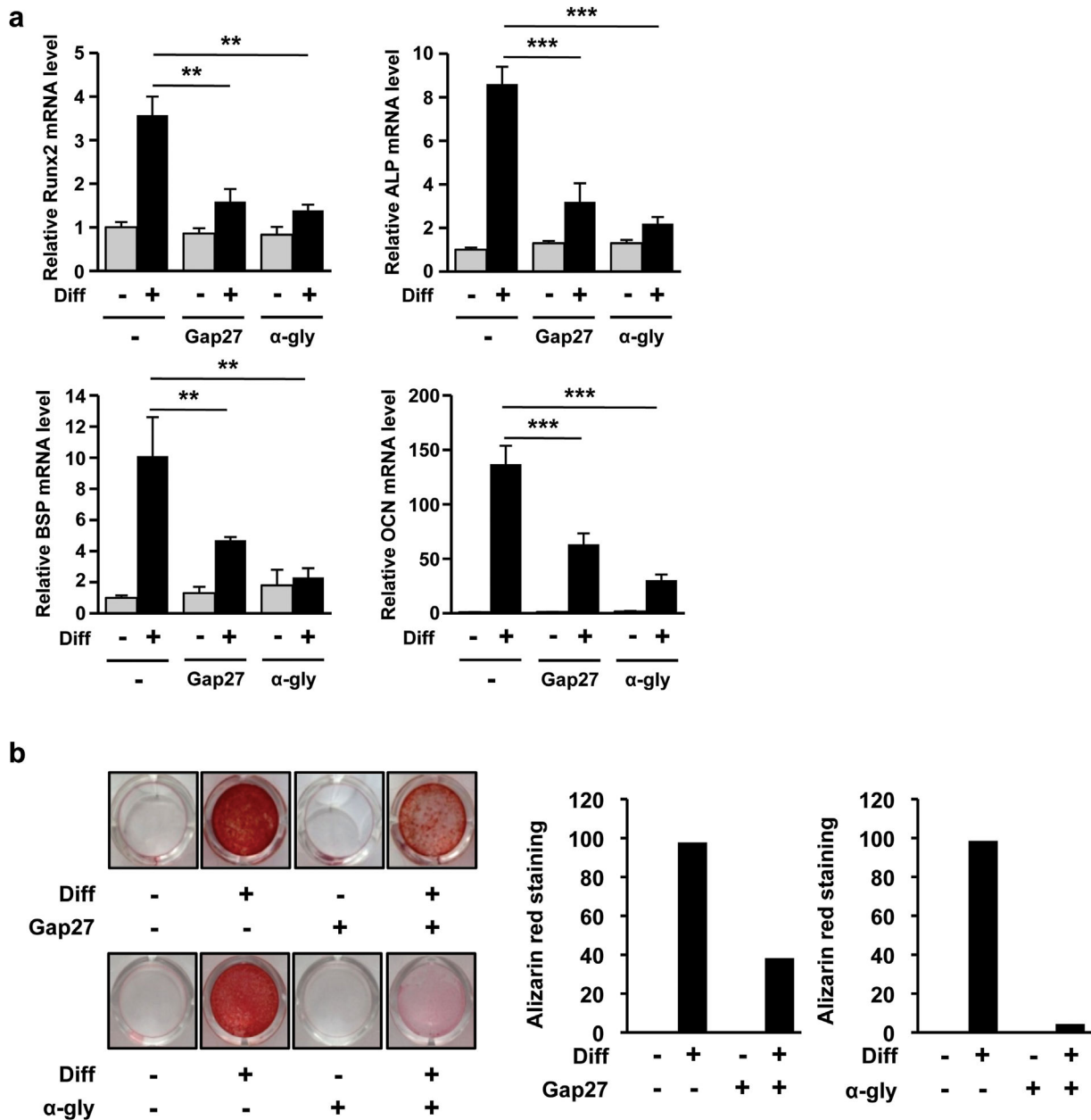


FIGURE 5 GJIC inhibitors reduce the differentiation of hBMSCs into osteoblasts. (a) hBMSCs were cultured in the presence of GJIC inhibitors (α -glycyrrhretinic acid or Gap27) as indicated. The expression of *Runx2* was determined by quantitative RT-PCR after treatment with osteogenic medium for 1 day. The expression of *ALP* was determined by quantitative RT-PCR after treatment with osteogenic medium for 7 days. Seventeen days after treatment of the cells with osteogenic medium (Diff), *BSP*, and *OCN* mRNA steady-state levels were determined by quantitative RT-PCR. Bars indicate mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate (** $p < 0.05$; *** $p < 0.01$). (b) Cultures were fixed and stained with Alizarin red S 17 days after induction of osteogenesis in the presence or absence of 18 α -glycyrrhretinic acid (50 μ M) or Gap27 (250 μ M). Results show one representative experiment of three independent experiments

Together, these results indicate an important role GJIC during the early differentiation of hBMSCs into osteoblasts and throughout the process of osteoblast differentiation.

4 | DISCUSSION

Previous in vitro studies have demonstrated the importance of Cx43 in osteoblast function and during the late stages of osteoblast differentiation specifically during the differentiation of immature

osteoblasts into mature osteoblasts able to mineralize (Plotkin & Bellido, 2013; Stains & Civitelli, 2016). In vivo experiments using either Cx43^{-/-} or Cx43^{fl/-};Col1a.1-2.3 kb-Cre mice have demonstrated that Cx43 plays a crucial role in osteoblastic differentiation (Plotkin & Stains, 2015). However, the role of Cx43 in the early differentiation of hBMSCs into osteoblasts in vitro remains poorly documented.

In the present study, we first demonstrate that Cx43 expression is increased at the transcriptional level during the late differentiation of hBMSCs into mature osteoblasts. Many transcription factors control osteoblastogenesis. Among them, activator protein-1 (AP-1), a dimeric

transcription factor formed by Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) and Jun proteins (c-Jun, JunB, JunD) is required for bone formation and remodeling (Eferl & Wagner, 2003). For example, most Fos proteins are implicated in the proliferation and differentiation of osteoblasts (Grigoriadis, Schellander, Wang, & Wagner, 1993). Interestingly, one AP-1-binding site has been identified in the human Cx43 proximal promoter P1 (approximately 150 nucleotides up- and downstream of the transcription initiation site), suggesting that this AP-1 response element could be involved in the increased expression of Cx43 during hBMSC differentiation into osteoblasts.

Additionally, we demonstrate that Cx43 and subsequent GJIC play an important role throughout the differentiation of hBMSCs into osteoblasts from the early stages to the process of mineralization. It is well recognized that gap junctional communication plays an important role in the control of differentiation into different cell types and tissues (Duval et al., 2002). Specifically, it has been shown that Cx43 and GJIC are crucial in the regulation of self-renewal and maintenance of pluripotency in embryonic stem cells (Todorova, Soria, & Quesada, 2008). With regard to hBMSC differentiation, osteoblastogenesis may be schematically defined by three phases (Marie, 2008): (1) the osteoblast commitment of hBMSCs and the early differentiation of hBMSCs into osteoblast progenitors; (2) the differentiation of these osteoblast progenitors into immature osteoblasts; and (3) the differentiation of immature osteoblasts into mature osteoblasts able to mineralize. All these three phases are characterized by sequentially expressed genes. The first stage is characterized by the expression of *Runx2*, the earliest and the most specific transcription factor of mesenchymal stem cell commitment toward osteoblastic lineage (Wagner & Karsenty, 2001). *Runx2* is indeed expressed in all mesenchymal condensations before osteoblast differentiation during early murine skeleton development at E10.5–E12.5 (Ducy, Zhang, Geoffroy, Ridall, & Karsenty, 1997). Our *in vitro* results showed that *Runx2* is induced very early, 1 day after stimulation of hBMSCs with osteogenic medium. This early increase in *Runx2* expression precedes the increased expression of ALP (expression peak at day 7), a gene specific to the differentiation of osteoblast progenitors into immature osteoblasts (the second stage of the differentiation process). In this work, we specifically demonstrated that the early increase in *Runx2* expression observed after stimulation of hBMSCs with differentiation medium is inhibited both by the use of an shRNA against Cx43 or by GJIC inhibitors, suggesting that Cx43 as well as GJIC play a role during the commitment of hBMSCs toward osteoblastic lineage or at least during the early stages of hBMSC differentiation into osteoblast progenitors. In addition, using hBMSCs rather than osteoblast progenitors used in previous studies, our results also demonstrated that Cx43 plays a central role during the differentiation of osteoblast progenitors into immature osteoblasts and later during the differentiation of these immature osteoblasts into mature osteoblasts.

Regarding the convergence of Cx43 and *Runx2* expressions, it has been previously demonstrated that the overexpression or knockdown of Cx43 is able to regulate the expression and/or the transcriptional activity of *Runx2* in several cells such as MC3T3-E1, mouse calvaria osteoblastic, human fetal osteoblastic, or longitudinal ligament cells (Li, Zhou, Saunders, & Donahue, 2006; Niger et al., 2011, 2012; Stains,

Lecanda, Screen, Towler, & Civitelli, 2003; Thi, Urban-Maldonado, Spray, & Suadicani, 2010; Yang et al., 2016). The studies on the molecular mechanism underlying this process have identified two effectors, the extracellular signal-regulated kinase (ERK) and the protein kinase C delta (PKC), responsible for Cx43-regulation of *Runx2* expression and/or *Runx2* transcriptional activity (Li et al., 2015; Lima, Niger, Hebert, & Stains, 2009; Niger et al., 2012, 2013; Tu et al., 2016).

Gap junctions can mediate the passage of nucleotides, amino acids, ions and second messengers between coupled cells allowing ionic and metabolic signaling communication (Harris, 2007). Among these messengers able to cross through gap junctional channels, there is evidence that the spatial and temporal patterns of calcium are crucial in the regulation of the differentiation process. Both the stable increase in Ca^{2+} intracellular concentration ($[Ca^{2+}]_i$), and the oscillations of $[Ca^{2+}]_i$ are a mode of signaling in both excitable and non-excitable cells. In bone marrow-derived stem cells, spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations were shown to depend on Inositol P3-mediated Ca^{2+} release followed by Ca^{2+} influx from the extracellular compartment (Kawano et al., 2002). In this context, it has been shown that $[Ca^{2+}]_i$ oscillations can be regulated by intercellular coupling through gap junctions (Dupont, Combettes, & Leybaert, 2007). We can thus hypothesize that Cx43-mediated gap junctional intercellular communication drives the differentiation of hBMSCs into osteoblasts via its ability to propagate $[Ca^{2+}]_i$ oscillations. However, future studies are required to establish the nature of the signals, Ca^{2+} or others, which drive the hBMSC differentiation process.

ACKNOWLEDGMENT

Jerome Amiaud for its technical help.

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

- Augello, A., & De Bari, C. (2010). The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. *Human Gene Therapy*, 21, 1226–1238.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., ... Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611–622.
- Chang, Y., Hsieh, P.-H., & Chao, C. C. (2009). The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential. *Chang Gung Medical Journal*, 32, 264–275.
- Chipoy, C., Berreur, M., Couillaud, S., Pradal, G., Vallette, F., Colombeix, C., ... Blanchard, F. (2004). Downregulation of osteoblast markers and induction of the glial fibrillary acidic protein by oncostatin M in osteosarcoma cells require PKCdelta and STAT3. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19, 1850–1861.
- De Leon, J. R., Buttrick, P. M., & Fishman, G. I. (1994). Functional analysis of the connexin43 gene promoter *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 26, 379–389.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., & Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747–754.
- Dupont, G., Combettes, L., & Leybaert, L. (2007). Calcium dynamics: Spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *International Review of Cytology*, 261, 193–245.

- Duval, N., Gomès, D., Calaora, V., Calabrese, A., Meda, P., & Bruzzone, R. (2002). Cell coupling and Cx43 expression in embryonic mouse neural progenitor cells. *Journal of Cell Science*, *115*, 3241–3251.
- Eferl, R., & Wagner, E. F. (2003). AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer*, *3*, 859–868.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: In vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and Tissue Kinetics*, *20*, 263–272.
- Grigoriadis, A. E., Schellander, K., Wang, Z. Q., & Wagner, E. F. (1993). Osteoblasts are target cells for transformation in c-fos transgenic mice. *The Journal of Cell Biology*, *122*, 685–701.
- Harris, A. L. (2007). Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *94*, 120–143.
- Kawano, S., Shoji, S., Ichinose, S., Yamagata, K., Tagami, M., & Hiraoka, M. (2002). Characterization of Ca(2+) signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium*, *32*, 165–174.
- Laird, D. W. (2014). Syndromic and non-syndromic disease-linked Cx43 mutations. *FEBS Letters*, *588*, 1339–1348.
- Lecanda, F., Towler, D. A., Ziambaras, K., Cheng, S. L., Koval, M., Steinberg, T. H., & Civitelli, R. (1998). Gap junctional communication modulates gene expression in osteoblastic cells. *Molecular Biology of the Cell*, *9*, 2249–2258.
- Lecanda, F., Warlow, P. M., Sheikh, S., Furlan, F., Steinberg, T. H., & Civitelli, R. (2000). Connexin43 deficiency causes delayed ossification, craniofacial abnormalities, and osteoblast dysfunction. *The Journal of Cell Biology*, *151*, 931–944.
- Li, Z., Zhou, Z., Saunders, M. M., & Donahue, H. J. (2006). Modulation of connexin43 alters expression of osteoblastic differentiation markers. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, *290*, C1248–C1255.
- Li, S., Zhang, H., Li, S., Yang, Y., Huo, B., & Zhang, D. (2015). Connexin 43 and ERK regulate tension-induced signal transduction in human periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Orthopaedic Research*, *33*, 1008–1014.
- Lima, F., Niger, C., Hebert, C., & Stains, J. P. (2009). Connexin43 potentiates osteoblast responsiveness to fibroblast growth factor 2 via a protein kinase C-delta/Runx2-dependent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, *20*, 2697–2708.
- Marie, P. J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *473*, 98–105.
- Neve, A., Corrado, A., & Cantatore, F. P. (2011). Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and Tissue Research*, *343*, 289–302.
- Nielsen, M. S., Axelsen, L. N., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M., & Holstein-Rathlou, N. H. (2012). Gap junctions. *Compr Physiol*, *2*, 1981–2035.
- Niger, C., Lima, F., Yoo, D. J., Gupta, R. R., Buo, A. M., Hebert, C., & Stains, J. P. (2011). The transcriptional activity of osterix requires the recruitment of Sp1 to the osteocalcin proximal promoter. *Bone*, *49*, 683–692.
- Niger, C., Buo, A. M., Hebert, C., Duggan, B. T., Williams, M. S., & Stains, J. P. (2012). ERK acts in parallel to PKC delta to mediate the connexin43-dependent potentiation of runx2 activity by FGF2 in MC3T3 osteoblasts. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, *302*, C1035–C1044.
- Niger, C., Lucioti, M. A., Buo, A. M., Hebert, C., Ma, V., & Stains, J. P. (2013). The regulation of runt-related transcription factor 2 by fibroblast growth factor-2 and connexin43 requires the inositol polyphosphate/protein kinase Cδ cascade. *Journal of Bone and Mineral Research*, *28*, 1468–1477.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *Journal of Cell Science Supplement*, *10*, 63–76.
- Paznekas, W. A., Karczeski, B., Vermeer, S., Lowry, R. B., Delatycki, M., Laurence, F., ... Jabs, E. W. (2009). GJA1 mutations, variants, and connexin 43 dysfunction as it relates to the oculodentodigital dysplasia phenotype. *Human Mutation*, *30*, 724–733.
- Plotkin, L. I., & Bellido, T. (2013). Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone*, *52*, 157–166.
- Plotkin, L. I., & Stains, J. P. (2015). Connexins and pannexins in the skeleton: Gap junctions, hemichannels and more. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*, 2853–2867.
- Schiller, P. C., Mehta, P. P., Roos, B. A., & Howard, G. A. (1992). Hormonal regulation of intercellular communication: Parathyroid hormone increases connexin 43 gene expression and gap-junctional communication in osteoblastic cells. *Molecular Endocrinology*, *6*, 1433–1440.
- Schiller, P. C., D'Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B. A., & Howard, G. A. (2001a). Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone*, *28*, 362–369.
- Schiller, P. C., D'Ippolito, G., Balkan, W., Roos, B. A., & Howard, G. A. (2001b). Gap-junctional communication mediates parathyroid hormone stimulation of mineralization in osteoblastic cultures. *Bone*, *28*, 38–44.
- Söhl, G., & Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research*, *62*, 228–232.
- Sosinsky, G. E., & Nicholson, B. J. (2005). Structural organization of gap junction channels. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1711*, 99–125.
- Stains, J. P., & Civitelli, R. (2016). Connexins in the skeleton. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *50*, 31–39.
- Stains, J. P., Lecanda, F., Screen, J., Towler, D. A., & Civitelli, R. (2003). Gap junctional communication modulates gene transcription by altering the recruitment of Sp1 and Sp3 to connexin-response elements in osteoblast promoters. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*, 24377–24387.
- Talbot, J., Brion, R., Picarda, G., Amiaud, J., Chesneau, J., Bougras, G., ... Verrecchia, F. (2013). Loss of connexin43 expression in Ewing's sarcoma cells favors the development of the primary tumor and the associated bone osteolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1832*, 553–564.
- Tellez-Gabriel, M., Charrier, C., Brounais-Le Royer, B., Mullard, M., Brown, H. K., Verrecchia, F., & Heymann, D. (2017). Analysis of gap junctional intercellular communications using a dielectrophoresis-based microchip. *European Journal of Cell Biology*, *96*, 110–118.
- Thi, M. M., Urban-Maldonado, M., Spray, D. C., & Suadicani, S. O. (2010). Characterization of hTERT-immortalized osteoblast cell lines generated from wild-type and connexin43-null mouse calvaria. *American Journal of Physiology Cell Physiology*, *299*, C994–C1006.
- Todorova, M. G., Soria, B., & Quesada, I. (2008). Gap junctional intercellular communication is required to maintain embryonic stem cells in a non-differentiated and proliferative state. *Journal of Cellular Physiology*, *214*, 354–362.
- Trichet, V., Benezech, C., Dousset, C., Gesnel, M. C., Bonneville, M., & Breathnach, R. (2006). Complex interplay of activating and inhibitory signals received by Vgamma9Vdelta2 T cells revealed by target cell beta2-microglobulin knockdown. *The Journal of Immunology*, *177*, 6129–6136.
- Tu, B., Liu, S., Liu, G., Li, Z., Sun, Y., & Fan, C. (2016). Inhibition of connexin 43 prevents trauma-induced heterotopic ossification. *Scientific Reports*, *6*, 37184.
- Väänänen, H. K. (2005). Mesenchymal stem cells. *Annals of Medicine*, *37*, 469–479.
- Valiunas, V., Doronin, S., Valiuniene, L., Potapova, I., Zuckerman, J., Walcott, B., ... Cohen, I. S. (2004). Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *Journal of Physiology*, *555*, 617–626.

- Wagner, E. F., & Karsenty, G. (2001). Genetic control of skeletal development. *Current Opinion in Genetics and Development*, 11, 527–532.
- Wennberg, C., Hessle, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U. H., & Millán, J. L. (2000). Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15, 1879–1888.
- Yang, H., Shi, L., Shi, G., Guo, Y., Chen, D., Chen, D., & Shi, J. (2016). Connexin 43 affects osteogenic differentiation of the posterior longitudinal ligament cells via regulation of ERK activity by stabilizing runx2 in ossification. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38, 237–247.
- Ziambaras, K., Lecanda, F., Steinberg, T. H., & Civitelli, R. (1998). Cyclic stretch enhances gap junctional communication between osteoblastic cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13, 218–228.

How to cite this article: Talbot J, Brion R, Lamora A, et al. Connexin43 intercellular communication drives the early differentiation of human bone marrow stromal cells into osteoblasts. *J Cell Physiol*. 2018;233:946–957.
<https://doi.org/10.1002/jcp.25938>

Titre : Rôle de la voie de signalisation Hippo dans le développement des ostéosarcomes

Mots clés : Ostéosarcome, YAP, Smad3, TEAD

Résumé : L'ostéosarcome (OS) est la tumeur osseuse primitive maligne la plus fréquente chez les enfants et les adolescents dont le pronostic reste mauvais, surtout lorsque des métastases sont présentes au diagnostic. Des analyses transcriptomique de biopsies de patients atteint d'OS révèlent la présence d'une signature génique de la voie de signalisation Hippo dans l'OS. Son principal effecteur, YAP, est connu pour son rôle oncogène dans un certain nombre de cancer. Afin d'étudier son rôle dans le développement de l'OS, nous avons développé une approche moléculaire en surexprimant une protéine YAP capable ou non d'interagir avec son facteur de transcription TEAD. Des expériences in vitro et in vivo révèlent le rôle crucial de TEAD dans la prolifération cellulaire et la croissance tumorale médiée par YAP. De plus nous avons montré que la surexpression de YAP augmente la migration cellulaire in vitro et la dissémination

métastatique in vivo, indépendamment de son interaction avec TEAD. Des analyses transcriptomique ont montré un enrichissement de gènes liés à la transition épithéliaux-mésenchymateuse, à la migration cellulaire et au TGF- β dans les cellules surexprimant YAP, quel que soit sa capacité à interagir avec TEAD. Des expériences de PLA et d'immunoprécipitation montrent une interaction YAP/Smad3, le principal effecteur de la voie du TGF- β . A l'aide d'un inhibiteur spécifique du TGF- β , le SD-208, nous montrons le rôle essentiel de la signalisation TGF- β /Smads dans la dissémination métastatique médiée par YAP. Ces résultats ont défini le rôle spécifique de TEAD et Smad3 dans la progression tumorale de l'OS, et identifié YAP comme un acteur central du développement de l'OS. Ainsi, YAP pourrait être une cible thérapeutique prometteuse dans l'OS.

Title: Role of the Hippo signalling pathway in osteosarcoma development

Keywords : Osteosarcoma, YAP, Smad3, TEAD

Abstract: Osteosarcoma (OS) is the most common primary malignant bone tumour in children and adolescents for whom the prognosis remains poor, especially when metastases are present at diagnosis. Transcriptomic analyses of biopsies from OS patients reveal the presence of an Hippo signalling pathway gene signature in the OS. Its main effector, YAP, is known for its oncogenic role in a number of cancers. In order to study its role in the development of OS, we developed a molecular approach by overexpressing YAP that could or not interact with its transcription factor TEAD. In vitro and in vivo experiments revealed the crucial role of TEAD in cell proliferation and tumor growth mediated by YAP. In addition, we showed that overexpression of YAP increases cell migration in vitro and

metastatic dissemination in vivo, regardless of its interaction with TEAD. Transcriptomic analysis showed a genes enrichment related to epithelial-mesenchymal transition, cell migration and TGF- β in cells overexpressing YAP, regardless of its ability to interact with TEAD. PLA and immunoprecipitation experiments showed YAP/Smad3 interaction, the main effector of the TGF- β pathway. Using a specific inhibitor of TGF- β , SD-208, we demonstrated the essential role of TGF- β /Smads signalling in YAP-mediated metastatic dissemination. These results defined the specific role of TEAD and Smad3 in the tumor progression of OS, and identified YAP as a central actor in the development of OS. Thus, YAP could be a promising therapeutic target in OS.