Normandie Université

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

# THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Préparée au sein de l'**Université de Caen Normandie**

## Métastases cérébrales d'origine bronchique : Rôle de l'interactome de la kinase NDR2

Présentée et soutenue par

**BIOJOUT TIPHAINE**

**Thèse soutenue le 25/09/2025**

devant le jury composé de :

| | | |
|---|---|---|
| M. LEVALLET JERÔME | Maître de conférences - UCN - Université de Caen Normandie | Directeur de thèse |
| MME LEVALLET GUENAELLE | Professeur des universités - CHU Caen Normandie - Hôpital Clémenceau | Co-directeur de thèse |
| M. SONCIN FABRICE | Directeur de recherche à l'INSERM - UNIVERSITE LILLE 1 SCIENCES ET TECHNOLOGIE | Président du jury |
| MME KARAYAN-TAPON LUCIE | Professeur des universités PraticienHosp - Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers | Membre du jury |
| M. TULASNE DAVID | Directeur de recherche à l'INSERM - Institut Pasteur | Membre du jury |
| MME JOFFRE CARINE | Chargé de recherche HDR - Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse | Rapporteur du jury |

Thèse dirigée par **LEVALLET JERÔME** (Imagerie et Stratégies Thérapeutiques pour les Cancers et Tissus Cérébraux) et **LEVALLET GUENAELLE** (Imagerie et Stratégies Thérapeutiques pour les Cancers et Tissus Cérébraux)

ED 497 NBISE
Normande de Biologie Intégrative, Santé, Environnement

IST2 Imagerie & Strategies Therapeutiques pour les Cancers & Tissus Cerebraux

# Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Mesdames et Messieurs les membres du jury pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail. Je vous en suis profondément reconnaissante.
Je tiens à remercier mes rapporteurs de thèse, le Dr Carine JOFFRE et le Dr Fabrice SONCIN, pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail.
J'adresse également toute ma gratitude au Pr Lucie KARAYAN-TAPON et au Dr David Tulasne pour avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je souhaite exprimer ma reconnaissance la plus sincère à mes directeurs de thèse, le Dr Jérôme LEVALLET et le Pr Guénaëlle LEVALLET, pour leur accompagnement précieux, leurs conseils avisés et leur constante disponibilité. Merci de m'avoir permis de poser mille et une questions et d'essayer d'y répondre, toujours avec bienveillance.
Je vous remercie aussi de m'avoir accueillie au sein de votre équipe dès le Master 1, puis en Master 2, et de m'avoir accordé votre confiance pour poursuivre ce travail en thèse.

Je souhaite également exprimer ma gratitude au Dr Nicolas ELIE et au Dr Didier GOUX du CMABIO, pour leur soutien technique, en particulier Nicolas, pour ses conseils et son accompagnement lors de mes nombreuses séances de microscopie confocale.

Je remercie Maëlle Guyot de la plateforme VIRTUAL'HIS pour son aide précieuse avec le microtome et pour sa grande disponibilité.

Je tiens à remercier le Dr Myriam BERNAUDIN, directrice de l'unité ISTCT, de m'avoir accueillie au sein de son unité pour la réalisation de ce travail. Je remercie également tous les membres du laboratoire, chercheurs comme étudiants, pour leur aide et leur gentillesse tout au long de ces années.
Une mention particulière à Ons, Yasmine et Jasmine, qui m'ont accompagnée tout au long de ces années, du stage de Master 1 jusqu'à la thèse. Une véritable épopée que nous avons traversée ensemble et qui touche bientôt à sa fin. Nous avons partagé des moments de joie, d'autres plus difficiles, mais aussi de nombreux fous rires et beaucoup de bonne humeur.

Votre présence a rendu cette aventure bien plus légère, enrichissante et joyeuse. Sans vous, le temps aurait été plus long… et bien moins drôle.
Je garde également un souvenir précieux de tous ces déjeuners partagés, véritables parenthèses de convivialité et de réconfort, avec vous mais aussi avec Manon, Simon, Marie ou encore Romain. Ces instants de pause ont souvent permis de recharger les batteries.

Un grand merci à Fatéméh pour sa joie de vivre et son enthousiasme. Ton aide précieuse et ta bienveillance ont illuminé certaines journées.

Je tiens à remercier Louise, Eva, Arthur G., Simon et Arthur L. pour leur gentillesse, leur bonne humeur tout au long de cette dernière année de thèse

Je souhaite également remercier Sterenn, embarquée dans la même galère, mais toujours d'un soutien indéfectible. Merci pour ta bienveillance, ta gentillesse, et tous ces moments de rire et de bonne humeur partagés.

Je remercie aussi France et Louise pour leur soutien : même si nous ne nous voyons pas souvent, vous avez toujours été présentes quand cela était nécessaire.

Un immense merci à ma famille, à mes parents et à mon frère, pour leur soutien et leurs encouragements constants tout au long de cette thèse.

# *Table des matières*

Table des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

**Introduction Générale** ..... 17

I – Les cancers bronchiques ..... 1

A. Généralités ..... 1

1) Epidémiologie ..... 1

2) Pronostic ..... 2

3) Causes ..... 2

B. Histologie ..... 3

C. Traitements ..... 4

1) Thérapie ciblées et anomalies moléculaires correspondantes ..... 4

2) Immunothérapie ..... 6

II – Les métastases cérébrales d'origine bronchique ..... 7

A. Epidémiologie ..... 7

B. Diagnostic ..... 7

C. Traitements ..... 8

III – Mécanismes de la transformation des cellules bronchiques et dissémination des cellules tumorales bronchiques ..... 9

A. Transformation tumorale ..... 9

1) L'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance ..... 12

2) Dérégulation du cycle cellulaire ..... 13

3) Echappement à l'apoptose ..... 14

4) Potentiel réplicatif illimité ..... 15

5) Acquisition du potentiel angiogénique ..... 16

6) L'évasion au système immunitaire ..... 16

7) Inflammation ..... 17

8) Instabilité génomique ..... 18

9) Reprogrammation métabolique ..... 18

10) Acquisition d'un phénotype invasif et métastatique ..... 18
B. Les différentes étapes de la dissémination métastatique ..... 19
1) Invasion ..... 21
2) Intravasation ..... 22
3) Survie des cellules tumorales dans la circulation ..... 22
4) Extravasation ..... 23
5) Colonisation du site secondaire et croissance ..... 24
6) La niche pré-métastatique et la niche métastatique ..... 27
IV – La voie de signalisation Hippo dans les CBNPC ..... 30
A. Généralités ..... 30
1) Découverte de la voie Hippo ..... 30
2) Composition et rôles ..... 30
3) Mécanismes de régulation de la voie Hippo ..... 32
B. Voie Hippo et carcinogenèse bronchique ..... 39
1) Recensement des dérégulations de la voie Hippo dans les cancers bronchiques ..... 39
2) Place des dérégulations de la voie Hippo dans la prolifération et l'instabilité génomique des cellules de cancers bronchiques ..... 42
3) Place des dérégulations de la voie Hippo dans la TEM et la mise en mouvement des cellules de cancers bronchiques ..... 44
4) Place des dérégulations de la voie Hippo dans la survie des cellules de cancers bronchiques ..... 46
5) Place des dérégulations de la voie Hippo dans l'établissement des CSC de cancers bronchiques ..... 46
6) Place des dérégulations de la voie Hippo dans le remodelage du microenvironnement 47
**Résultats Partie I** ..... 51
L'activation de NDR2 induite par l'hypoxie tumorale contribue à la formation des métastases cérébrales du cancer bronchique non à petites cellules ..... 51
I – Hypoxie ..... 53
A. Hypoxie et HIF ..... 53
1) Généralités ..... 53
2) Régulation moléculaire des HIF ..... 53
B. Hypoxie et CBNPC ..... 55
1) Hypoxie tumorale et activation des HIF ..... 55

2) Hypoxie et instabilité génétique ..... 56
3) Angiogenèse ..... 57
4) Reprogrammation métabolique induite par HIF-1α ..... 58
5) Hypoxie, TEM, migration et invasion ..... 60
6) Hypoxie, microenvironnement tumoral et tolérance immunitaire ..... 61
7) Hypoxie et exosomes ..... 63
8) Hypoxie et résistance aux traitements ..... 64
C. Hypoxie et voie Hippo ..... 65
1) CTGF, médiateur entre HIF et YAP-1/TAZ ..... 65
2) Interactions entre HIF-1α et YAP-1/TAZ ..... 66
3) Les protéines SIAH1/2 : inhibition de LATS2 et activation de YAP-1/TAZ ..... 68
4) VEGFA: médiateur angiogénique entre HIF et YAP-1/TAZ ..... 68
5) RCPG : lien entre hypoxie, YAP-1/TAZ et HIF-1α ..... 69
II – L'activation de NDR2 induite par l'hypoxie tumorale contribue à la formation des métastases cérébrales du cancer bronchique non à petites cellules ..... 69
**Résultats Partie II** ..... 97
Identification de l'interactome de la kinase NDR2 dans les cellules de CBNPC ..... 97
**Résultats Partie III** ..... 123
NDR2 régule la migration des cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules en cas de famine en soutenant la biogenèse des autophagosomes par la régulation de LC3 et d'ATG9A ..... 123
I – Autophagie ..... 125
A. Généralités ..... 125
B. Les différents types d'autophagies ..... 126
*1) Microautophagie* ..... 126
*2) Autophagie dépendante des chaperonnes (CMA)* ..... 128
*3) Macroautophagie* ..... 130
4) La protéine ATG9A et son implication dans les processus autophagiques ..... 145
5) Régulation transcriptionnelle et épigénétique des gènes de l'autophagie ..... 150
C. Autophagie et cancer ..... 153
1) Suppresseur de tumeur ..... 153
2) Oncogène ..... 154
D. Autophagie et CBNPC ..... 165

1) Développement tumoral ..... 165
2) Formation de métastases issues de CBNPC ..... 166
3) Rôles suppresseurs de tumeur de l'autophagie dans les CBNPC ..... 167
4) Autophagie et résistance aux traitements ..... 167
5) L'autophagie comme acteur dans la sensibilisation aux traitements ..... 168
E. Autophagie et la voie de signalisation Hippo ..... 169
II – NDR2 régule la migration des cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules en cas de famine en soutenant la biogenèse des autophagosomes par la régulation de LC3 et d'ATG9A ..... 173
**DISCUSSION GENERALE** ..... 226
**CONCLUSION/PERSPECTIVES** ..... 240
**BIBLIOGRAPHIE** ..... 248
**Résumé**

# Table des figures

***Figure 1 :*** *Incidence des cancers bronchiques en France ……p1*

***Figure 2 :*** *facteurs de risques liés aux cancers bronchiques ……p3*

***Figure 3 :*** *Les étapes de la carcinogenèse bronchique ……..p10*

***Figure 4 :*** *Dissémination métastatique de cellules cancéreuses ……p20*

***Figure 5 :*** *Étapes de la dissémination métastatique et extravasation des cellules tumorales vers le cerveau ……p26*

***Figure 6 :*** *Mise en place de la niche pré-métastatique ……..p28*

***Figure 7 :*** *Le voie de signalisation Hippo ……p31*

***Figure 8 :*** *Régulation de la Voie Hippo ……p33*

***Figure 9 :*** *Influence des stimuli mécaniques sur la localisation subcellulaire de YAP-1/TAZ ….p35*

***Figure 10 :*** *Régulation de la voie Hippo dans les cellules saines et tumorales du CBNPC ……p41*

***Figure 11 :*** *Implication de RASSF1A dans la régulation du cycle cellulaire ……p43*

***Figure 12 :*** *Implication de NDR2 dans la régulation du cycle cellulaire ……p44*

***Figure 13 :*** *Impact de l'activation de YAP-1/TAZ sur le stroma tumoral……p48*

***Figure 14 :*** *Régulation de HIF-1α selon l'état d'oxygénation cellulaire ……p54*

***Figure 15 :*** *Effets de l'hypoxie sur le microenvironnement tumoral ……p62*

***Figure 16 :*** *Régulation de YAP-1/TAZ par l'hypoxie dans le contexte tumoral……..p67*

***Figure 17 :*** *Microautphagie ……p125*

***Figure 18 :*** *Autophagie médiée par les chaperonnes (CMA)……..p127*

***Figure 19 :*** *les différentes étapes de l'autophagie chez les mammifères ……p129*

***Figure 20 :*** *Structure et régulation du complexe ULK chez les mammifères ……p131*

***Figure 21 :*** *Structure et activation du complexe PI3KC3……p134*

***Figure 22 :*** *Étapes clés de la formation du phagophore ……..p136*

***Figure 23 :*** *Les deux systèmes de conjugaison de type ubiquitine impliqués dans l'autophagie (ATG12 et LC3)……p137*

***Figure 24 :*** *Expansion du phagophore dépendant d'ATG9A ……p139*

***Figure 25 :*** *Rôle des protéines ESCRT dans la fermeture du phagophore ……p141*

***Figure 26 :*** *Trafic et fusion des autophagosomes et autolysosomes……p142*

***Figure 27 :*** *Structure ATG9A humain ……p144*

***Figure 28 :*** *Fonctions de l'autophagie dans le développement tumoral ……..p153*

***Figure 29 :*** *Rôle de l'autophagie dans la progression tumorale ……..p162*

***Figure 30 :*** *Action des différentes membranes de la voie Hippo dans le processus autophagique…….p165*

# Liste des tableaux

***Tableau 1 :*** *Altérations moléculaires majeures et ciblables dans les CBNPC …….p5*

***Tableau 2 :*** *Caractéristiques et différences entre la niche pré-métastatique et la niche métastatique……p28*

***Tableau 3 :*** *Les différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'autophagie.……p149*

# Liste des abréviations

ADAM12 : A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 12

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AF : Adhésion focale

AKT : Protein Kinase B

AMBRA1 : Autophagy and Beclin-1 regulator 1

AMOT : Angiomotin

AMPK : AMP-activated Protein Kinase

AP : Adaptor protein

ARN : Acide ribonucléique

Arf : ADP ribosylation factor
Arl1 : ADP-ribosylation factor-like protein 1

ATG14L : Autophagy Related 14 Like

ATP : Adenosine Triphosphate

BCRP : Breast Cancer Resistance Protein

BIM : Bcl-2-like protein 11

BMF : Bcl-2-modifying factor

BMP-2 : Bone Morphogenetic Protein 2

BNIP3 : BCL2 Interacting Protein 3

BRCA1/2 : Breast Cancer 1/2

CA-IX : Carbonic Anhydrase IX

CARM1 : Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1

CASA : Autophagie sélective assitée par les chaperonnes

CDK2 : Cyclin-Dependent Kinase 2

COX-2 : Cyclooxygenase-2

Crb : Crumbs Homolog

CSC : Cellules Souches Cancéreuses

CTGF : Connective Tissue Growth Factor

CMA : Autophagie dépendante des chaperonnes

CMH-I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I

ctDNA : ADN tumoral circulant

Cyr61 : Cysteine-rich angiogenic inducer 61

DFCP1 : double FYVE-containing protein 1
DSB : Brin double sens

EGF : Epidermal Growth Factor

EHMT2 : Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 2

EIF2S1 : Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Subunit 1

eIF3H : Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit H

ELF3 : E74 Like ETS Transcription Factor 3

EML4 : Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4

EPG5 : Ectopic P-granules Autophagy Protein 5 Homolog

EPO : Erythropoietin

FAK : Focal Adhesion Kinase

FGF : Fibroblast Growth Factor

FIH1 : Factor Inhibiting HIF1

FIP200 : Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD
FOXO1 : Forkhead Box O1

GLUT-1 : Glucose Transporter Type 1

HB-EGF : Heparin-binding EGF-like growth factor

HDAC : Histone Deacetylase

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIF-1α/2α : Hypoxia-Inducible Factor 1/2 Alpha

HMG1 : High Mobility Group Protein 1

HOPS : Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting

HRE : Hypoxia Response Elements

HSP90B1 : Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1

IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1

IGFBP3 : Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3

IL-6 : Interleukin 6

INV : Involucrin

ISCU : Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme

JNK : c-Jun N-terminal kinase

LAMP2A : Lysosomal-Associated Membrane Protein 2A

LATS1/2 : Large Tumor Suppressor Kinase 1/2

LDHA : Lactate Dehydrogenase A

LPA : lysophosphatidic acid

MAP1S : Microtubule-associated protein 1S

MC : Métastase cérébrale

MCT4 : Monocarboxylate Transporter 4

MEC : Matrice Extracellulaire

MISP : Mitotic Spindle Positioning

MOB1/2 : Mps One Binder Kinase Activator-like 1/2

MPZL1 : Myelin Protein Zero Like 1

MRP1 : Multidrug Resistance-associated Protein 1

MST1/2 : Mammalian Sterile 20-like Kinase 1/2

mTORC1 : Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1

MVB : corps multivésiculaires

NDR1/2 : Nuclear Dbf2-related Kinase 1/2

NF2 : Neurofibromin 2

NHE1 : Sodium-hydrogen exchanger 1

NIPBL : Nipped-B Homolog

NLK : Nemo-like Kinase

OGT : O-linked N-acetylglucosamine Transferase

P21 : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1

PAI1 : Plasminogen Activator Inhibitor 1

PALS1 : Protein Associated with Lin Seven 1

PARD3 : Partitioning Defective 3 Homolog

PATJ : Pals1-associated Tight Junction Protein

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PHD : Prolyl-hydroxylase

PE : Phosphatidyléthanolamine

PERK : Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PI3KC3 : complexe PI3K de classe III

PI4KIIIβ : Phosphatidylinositol 4-Kinase III beta

PITPNB : Phosphatidylinositol Transfer Protein Beta

PKA : Protein Kinase A

PKM2 : Pyruvate Kinase M2

PLEKHM1 : Pleckstrin Homology Domain Containing Family M Member 1

PTEN : Phosphatase and Tensin Homolog

PTK2 : Protein Tyrosine Kinase 2

Rab : Ras-related protein

RAP : Ras-related protein Rap

RASSF1 : Ras Association Domain Family Member 1

RB : Retinoblastoma protein

RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G

RE : Réticulum Endoplasmique

Rho : Ras homolog gene

RME-8/DNAJC13 : Receptor Mediated Endocytosis 8 / DnaJ Heat Shock Protein Family Member C13

ROCK1 : Rho-associated Protein Kinase 1

ROS : Reactive Oxygen Species

RUBICON : Rubicon Autophagy Regulator

S1P : sphingosine-1-phosphate

SAV1 : Salvador Homolog 1

SCRIB : Scribble planar cell polarity protein

SENP2 : SUMO1/Sentrin Specific Peptidase 2

SIAH1/2 : Seven in Absentia Homolog 1/2

siARN : Small interfering RNA

SIRT1 : Sirtuin 1

SKIL : Ski-like Oncogene

SNAP29 : Synaptosomal-associated Protein 29

SNARE : Soluble NSF Attachment Protein Receptor

SQSTM1/p62 : Sequestosome 1

Src : Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src

ST3GAL2 : ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 2

STX17 : Syntaxin 17

TBC1D14 : TBC1 Domain Family Member 14

TCF : T-cell Factor

TEAD : TEA Domain Family Member

TECPR1 : Tectonin Beta-Propeller Repeat Containing 1

TFE3 : Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3

TFEB : Transcription Factor EB

TGN : Trans-Golgi Network

TRIM27 : Tripartite Motif Containing 27

TSTA3 : Tissue Specific Transplantation Antigen P35B

TTLL4 : Tubulin Tyrosine Ligase Like 4

TWIST : Twist Family BHLH Transcription

ULK : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase

UVRAG : UV Radiation Resistance Associated

VAMP8 : Vesicle-associated Membrane Protein 8

VAV2 : Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 2

VPS34 : Vacuolar Protein Sorting 34

WDR5 : WD Repeat Domain 5

WIPI : WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting

XPO1 : Exportin 1

ZEB1 : Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1

ZKSCAN3 : Zinc Finger with KRAB and SCAN Domains 3

ZSWIM1 : Zinc Finger SWIM-type Containing 1

# Introduction Générale

# I – Les cancers bronchiques

## A. Généralités

### 1) Epidémiologie

En France, le cancer bronchique est le troisième cancer le plus fréquent après ceux du sein et du côlon, mais reste la première cause de mortalité par cancer, comme à l'échelle mondiale. En 2020, on recensait 2,2 millions de nouveaux cas et 1,8 million de décès dans le monde. En 2023, 52 777 nouveaux cas ont été diagnostiqués en France (33 438 hommes, 19 339 femmes). Si l'incidence est stable chez l'homme, elle progresse de 4,3 % par an chez la femme depuis 2010, en lien probable avec l'augmentation du tabagisme (Institut du Cancer (INCA)) (*Figure 1*).

L'âge médian au diagnostic est de 68 ans chez l'homme et 66 ans chez la femme. La survie globale à 5 ans est faible (19 %), et tombe à 5 % en cas de stade métastatique (INCA).

Aux stades précoces, la maladie est souvent asymptomatique. Les signes les plus fréquents incluent une toux, une dyspnée et une altération de l'état général. Les métastases cérébrales peuvent se manifester par des céphalées, des nausées, des vomissements, des crises convulsives ou des troubles neurocognitifs (OMS).

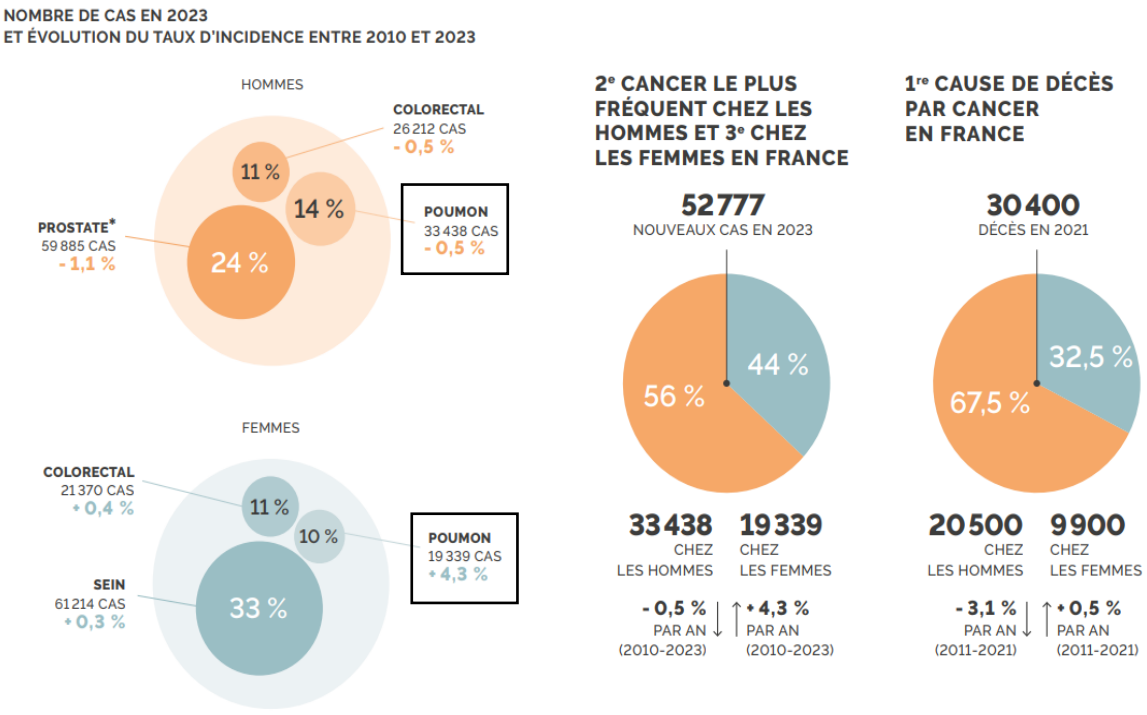



***Figure 1 : Incidence des cancers bronchiques en France (INCA).***

### 2) Pronostic

Le pronostic des patients atteints de cancer bronchique dépend de la précocité du diagnostic. Or celui-ci est souvent fait à un stade avancé de la maladie du fait de la non spécificité des symptômes, rendant un diagnostic précoce difficile à réaliser. Le diagnostic repose sur un examen clinique, une radiographie thoracique, un scanner thoracique, ainsi qu'une biopsie permettant l'analyse histopathologique et un profilage moléculaire afin d'identifier les altérations moléculaires pouvant être ciblées. Actuellement aucun dépistage du cancer du poumon de grande envergure n'est réalisé en France. Toutefois, l'institut national du cancer a annoncé en janvier 2025, la mise en place d'un programme pilote de dépistage des cancers du poumon nommé IMPULSION (**IMP**lémentation du dépistage du cancer **PUL**monaire en populat**ION**), dont les premières inclusions devraient débuter fin 2025. Le dépistage reposera sur la réalisation d'un scanner thoracique à faible dose et l'accompagnement à l'arrêt du tabac pour les fumeurs. Le dépistage pourrait induire une diminution de 20 à 25% de la mortalité spécifique par cancer bronchique (études internationales NLST, NELSON).

### 3) Causes

Le développement des cancers bronchiques est étroitement lié à l'exposition à divers agents présents dans l'environnement général, professionnel, ainsi qu'aux habitudes de vie (INCA, OMS) (*Figure 2*) :

- Le tabagisme actif constitue le principal facteur de risque, responsable de plus de 80 % des cas.
- Le tabagisme passif peut également favoriser l'apparition de cancers bronchiques.
- L'exposition au radon, un gaz radioactif naturel, incolore et inodore, représente aussi des risques significatifs.
- La pollution de l'air
- L'alimentation joue un rôle non négligeable : une consommation insuffisante de fruits et de fibres serait impliquée dans environ 5,4 % des cas.
- Les facteurs génétiques contribuent également à la prédisposition au cancer bronchique.

Il est également à noter que des études ont révélé que les populations de faible niveau socio-économique avaient une prévalence plus importante aux facteurs de risque lié à l'environnement professionnel (INCA, OMS).

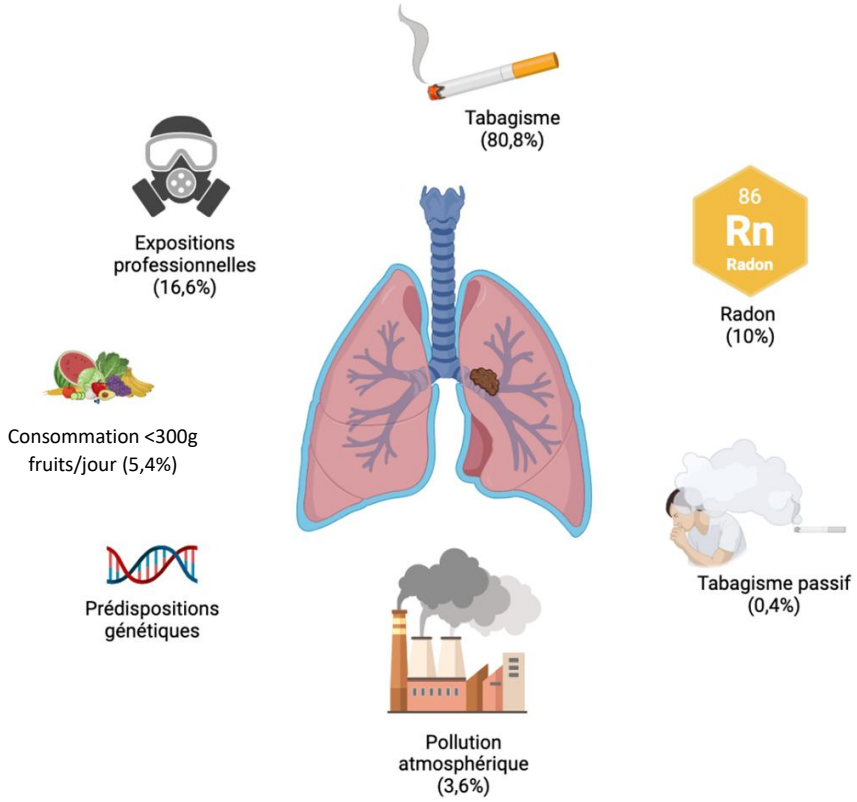



***Figure 2 : facteurs de risques liés aux cancers bronchiques (Centre Léon Bérard, https://www.cancer-environnement.fr)***

## B. Histologie

Les cancers bronchiques se répartissent en deux grandes catégories : les cancers bronchiques à petites cellules et les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) représentant respectivement 15 et 85 % des cas. Dans la suite de ce manuscrit nous traiterons uniquement des CBNPC. Ces derniers sont subdivisés en plusieurs sous-classe :

- **L'adénocarcinome bronchique** représente environ 40 % des CBNPC, est une tumeur épithéliale à différenciation glandulaire, caractérisée par la présence de mucosécrétion et/ou de structures glandulaires. Il se développe en périphérie pulmonaire, avec une prolifération le long des alvéoles, sans envahissement stromal, vasculaire, pleural ni atteinte ganglionnaire.

- **Le carcinome épidermoïde** correspond à 30% des CBNPC. C'est une tumeur maligne épithéliale, présentant une différenciation malpighienne. Il siège principalement dans les bronches proximales, en position péri- ou endobronchique. Sur le plan morphologique, il se caractérise par des ponts intercellulaires et des foyers de kératinisation.
- **Le carcinome indifférencié à grandes cellules** constitue environ 15% des cas, est une tumeur peu différenciée, composée de grandes cellules atypiques, sans mucosécrétion ni différenciation épidermoïde, ce qui en fait un diagnostic d'exclusion. Il peut se développer dans toutes les régions pulmonaires et se distingue par son agressivité locale.

## C. Traitements

La prise en charge du CBNPC dépend du stade tumoral, du type histologique et des caractéristiques moléculaires. Pour les stades précoces, une résection chirurgicale complète peut être envisagée lorsque l'extension tumorale et l'état général du patient le permettent. Cette approche est généralement associée à une chimiothérapie adjuvante afin de réduire le risque de récidive (Couraud, 2025).

Pour les patients atteints d'un CBNPC non opérable en raison de leur comorbidités générales ou respiratoires, la radiothérapie stéréotaxique constitue le traitement de référence, suivie d'une chimiothérapie complémentaire (Couraud, 2025).

Pour les stades localement avancés non résécables, la prise en charge repose sur une radiochimiothérapie concomitante, combinant une chimiothérapie à base de sels de platine et une radiothérapie thoracique. L'ajout de thérapies ciblées a permis une amélioration de la survie dans certaines sous-populations de patients atteints de CBNPC (Couraud, 2025).

### 1) Thérapies ciblées et anomalies moléculaires correspondantes

La mise en évidence de mutations activatrices impliquées dans le développement et l'agressivité du CBNPC a profondément modifié son approche thérapeutique. L'identification d'altérations génétiques ciblables a permis le développement de thérapies personnalisées,

fondées sur le profil moléculaire tumoral, avec des réponses cliniques marquées, notamment grâce aux inhibiteurs de tyrosine kinase (*Tableau 1*).

***Tableau 1 : Altérations moléculaires majeures et ciblables dans les CBNPC***

| Gènes | Altération | Fréquence | Mécanisme d'activation | Thérapie (FDA et/ou EMA) | Essais/Etude | Méthode de détection |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***EGFR*** | Mutation Exon19/21 (del19, L858R) | 15% | Activation constitutive du domaine kinase | Osimertinib | FLAURA, ADAURA, LAURA | NGS, PCR, IHC mutation-spécifique |
| | Insertion exon20 | 5-10% des mutation EGFR | Bloque la liaison des TKI | Amivantamab ± lazertinib | PAPILLON, MARIPOSA, MARIPOSA-2 | NGS, PCR |
| | Mutations atypiques (G719X, L861Q, S768I) | ≈10 % des mutations EGFR | Mutations variées, activation oncogène variable | Afatinib | | NGS, PCR, IHC |
| ***KRAS*** | Mutations G12C, G12D, G12V, G13, Q61 | 12-16% | RAS actif | Sotorasib, adagrasib | CodeBreaK100, KRYSTAL-1 | NGS, PCR |
| ***ALK*** | Réarrangement/fusion (ex : EML4 ::ALK) | 5% | Fusion générant une activation constitutive du domaine kinase | Alectinib, brigatinib, lorlatinib, crizotinib, ensartinib | ALINA, ALEX, CROWN, ALTA-1L | IHC (D5F3), FISH, NGS |
| ***ROS1*** | Réarrangement/fusion (ex : CD74::ROS1) | 1-2% | Activation constitutive du domaine kinase | Crizotinib, entrectinib, lorlatinib | PROFILE 1001, STARTRK, TRIDENT | IHC, FISH, NGS |
| ***RET*** | Réarrangement/fusion (ex : KIF5B::RET) | 1-2% | Activation constitutive du domaine kinase | Selpercatinib, Pralsetinib | LIBRETTO-431, ARROW | NGS, RT-PCR, FISH |
| ***MET*** | Saut de l'exon 14 | 3-5% | Perte du domaine régulation : accumulation de MET actif | Capmatinib, Tepotinib | GEOMETRY mono-1, VISION | NGS RNA/DNA, RT-PCR |
| | Amplification | 1-5% | | ± crizotinib | | FISH (MET/CEP7), NGS |
| ***BRAF*** | Mutations de classe I (V600E/KIR) Mutation Exon11 | 2-4% | Activation constitutive ; peut avoir une dépendance à RAS | Dabrafenib + Trametinib | NCT01336634, PHAROS | NGS, PCR, IHC (V600E), ddPCR |
| ***ERBB2 (HER2)*** | Amplification ou insertion Exon20 | 2-3% | | Trastuzumab deruxtecan (TDXd) | DESTINY-Lung1/02 | NGS RNA/DNA |
| ***NTRK1/2/3*** | Réarrangement/fusion | <0,5% | Activation constitutive du domaine kinase | Larotrectinib, Entrectinib | NAVIGATE, SCOUT, STARTRK | NGS RNA/DNA, IHC (pan-TRK), FISH |

### 2) Immunothérapie

Le PD-L1 (Programmed Death Ligand-1), exprimé notamment à la surface des cellules tumorales et des cellules immunitaires, joue un rôle central dans les mécanismes d'échappement immunitaire. Il est surexprimé chez environ 50 % des patients atteints de CBNPC, en particulier chez les fumeurs et souvent dès les stades précoces de la maladie. De ce fait, PD-L1 est une cible thérapeutique privilégiée de l'immunothérapie (Odintsov & Sholl, 2024; Jeon et al., 2025).

Les anticorps inhibiteurs de points de contrôle immunitaire ciblant PD-1 (Programmed Death-1), PD-L1 ou CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) sont des traitements standards en première ou deuxième ligne. Différentes approches sont observées selon l'expression de PD-L1 : lorsque PD-L1 est fortement exprimée une monothérapie est envisageable avec le pembrolizumab, lorsque l'expression de PD-L1 est faible ou négative, une combinaison du pembrolizumab et de chimiothérapie est réalisée (Odintsov & Sholl, 2024; Jeon et al., 2025).

Comme pour d'autres approches thérapeutiques, des mécanismes de résistance à l'immunothérapie peuvent survenir. Une faible expression ou la perte d'expression de PD-L1 après traitement, en est un exemple. Les tumeurs dites « froides », pauvres en lymphocytes T $CD8^+$ infiltrants, constituent également un obstacle majeur. D'autres mécanismes incluent la perte d'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité, compromettant la présentation des néoantigènes, ainsi que des mutations des gènes *JAK1* ou *JAK2 (Janus Kinase)*, limitant la réponse aux interférons. L'accumulation de cellules T régulatrices (Treg) et de cellules myéloïdes suppressives contribue aussi à l'échec de la réponse immunitaire antitumorale (Odintsov & Sholl, 2024; Jeon et al., 2025).

# II – Les métastases cérébrales d'origine bronchique

## A. Epidémiologie

Environ 20% des patients atteints de cancers développeront des métastases cérébrales (MC) au cours de l'évolution de leur maladie. Les cancers les plus fréquemment associés aux MC sont les cancers du poumon avec 20 à 56% des patients concernés, les cancers du sein (5 à 20%) et le mélanome avec (7 à 16%) (Achrol et al., 2019). Dans les CBNPC, environ 10 à 20% des patients présentent des MC au moment de leur diagnostic et 40 % en développeront au cours de leur maladie (Souza et al., 2023). La plupart des patients atteints de CBNPC porteur d'une mutation *EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor)* ou d'une translocation *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) développeront une atteinte du système nerveux central (Rangachari et al., 2015).

Le développement de MC constitue un facteur de mortalité accrue chez les patients atteints de cancer à un stade avancé. Elles conservent les altérations moléculaires de la tumeur primitive, mais peuvent également acquérir de nouvelles anomalies. Des discordances moléculaires ont été observées, en particulier dans les voies impliquées dans la réponse immunitaire, le métabolisme et la signalisation cellulaire (Hubbs et al., 2010; Achrol et al., 2019).

## B. Diagnostic

Sur le plan clinique, les MC se traduisent par des céphalées, des déficits neurologiques focaux, des crises épileptiques ou une détérioration de l'état mental. L'imagerie de référence demeure l'imagerie par résonance magnétique cérébrale après injection de gadolinium, toutefois la confirmation diagnostique repose, lorsque cela est réalisable, sur l'examen histopathologique du prélèvement tumoral. La biopsie tissulaire cérébrale étant une procédure invasive et parfois irréalisable, les biopsies liquides apparaissent comme une alternative diagnostique prometteuse en raison de leur caractère peu invasif et répétable (Bracht et al., 2018). Différentes sources biologiques peuvent être utilisées telles que le plasma ou le liquide céphalo-rachidien, ainsi que l'ADN tumoral circulant (ctDNA). Bien que les biopsies liquides permettent d'établir un diagnostic moléculaire, de surveiller la réponse thérapeutique ou de détecter précocement les rechutes, leur utilisation reste limitée par la

faible quantité de ctDNA, ainsi que par l'absence actuelle de standardisation des méthodes d'analyse et de validation clinique à grande échelle (Lone et al., 2022; Souza et al., 2023).

Sur le plan moléculaire, les MC issues de CBNPC présentent des altérations récurrentes, affectant notamment les gènes *EGFR, TP53 (Tumor protein 53), KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) (Andrews et al., 2023). Les mutations de *TP53*, bien que non considérées comme motrices, sont fortement liées à la dissémination métastatique (Van Egeren et al., 2022). Parallèlement, les altérations activatrices d'*EGFR* entraînent une prolifération et une invasion accrues, augmentant le risque de MC (Roskoski, 2014; Tan et al., 2020). D'autres anomalies telles que les réarrangements des gènes *ALK* et *RET* (*Rearranged during transfection* ) jouent un rôle crucial dans la survenue des MC (H. Wang et al., 2020). En particulier, les fusions EML4::ALK qui active des voies de signalisation pro-oncogéniques telles que PI3K (phosphoinositide 3-kinase)-AKT (Protein Kinase B)**,** MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et JAK-STAT (H. Wang et al., 2020). Les fusions *RET* sont quant à elles observées dans 25 à 50 % des MC (A. E. Drilon et al., 2017), soulignant leur implication dans la progression métastatique. Les réarrangements du gène *ROS1* sont également retrouvés dans la formation des MC, représentant 20 à 30 % des cas au moment du diagnostic (A. Drilon et al., 2020).

L'amplification du gène *MET* constitue un autre facteur clé, favorisant la migration cellulaire et la dissémination tumorale à distance, y compris vers le cerveau (Baldacci et al., 2018). Les mutation KRAS contribuent à l'évasion immunitaire *via* la régulation de PD-L1 (C. Liu et al., 2022; Rosell et al., 2024). D'autres mutations moins fréquentes, telles que celles de *BRAF, CAV1, AKT1, NRAS* et *PTEN*, ainsi que l'activation de la voie WNT/TCF et la surexpression de CD44, participent également à la colonisation cérébrale (Nguyen et al., 2009).

## C. Traitements

La prise en charge des MC est multimodale, elle associe selon les cas une chirurgie quand cela est possible (métastase unique, associée à un bon état général), une radiothérapie, le plus souvent stéréotaxique, de chimiothérapie systémique. Le traitement tend également à être de plus en plus personnalisé avec l'immunothérapie et les thérapies ciblées (Achrol et al., 2019; Mitchell et al., 2022). Toutefois, certaines limites persistent telles que la radionécrose, observée chez près d'un tiers des patients, ou l'incapacité de certains traitements à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Colaco et al., 2016; Boire et al., 2020).

# III – Mécanismes de la transformation des cellules bronchiques et dissémination des cellules tumorales bronchiques

## A. Transformation tumorale

La carcinogenèse bronchique est un processus complexe et multi-étapes, qui conduit à la transformation maligne des cellules épithéliales pulmonaires. Elle s'inscrit dans le cadre plus général de l'oncogenèse, tel que théorisé par Hanahan et Weinberg dans leur modèle des « caractéristiques fondamentales du cancer » (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011) (*Figure 3*). Ce modèle identifie un ensemble de propriétés biologiques acquises progressivement par les cellules tumorales au cours de leur évolution, constituant un schéma universel de transformation cellulaire maligne.

Dans le cas des carcinomes bronchiques, ces étapes comprennent (*Figure 3*) :

- **L'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance** : les cellules acquièrent la capacité de proliférer sans dépendre des facteurs mitogènes exogènes, *via* l'activation constitutive de voies de signalisation telles que EGFR ou KRAS.
- **La dérégulation du cycle cellulaire** : des altérations des régulateurs du cycle permettant une prolifération incontrôlée.
- **L'échappement à l'apoptose** : les cellules évitent les mécanismes de mort programmée, notamment *via* la surexpression de protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 (B-cell lymphoma 2).
- **L'acquisition d'un potentiel réplicatif illimité** : par la réactivation de la télomérase, les cellules échappent à la sénescence.
- **L'induction de l'angiogenèse** : essentielle pour alimenter la croissance tumorale, cette étape est souvent médiée par une surexpression du VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor).
- **L'évasion au système immunitaire** : les cellules tumorales développent des mécanismes pour échapper à la surveillance immunitaire, tels que l'expression de PD-L1.
- **L'inflammation pro-tumorale** : un microenvironnement inflammatoire favorise la progression tumorale.

- **La dérégulation du métabolisme cellulaire** : un remodelage du métabolisme énergétique (effet Warburg) permet de répondre aux besoins accrus en énergie et biosynthèse.
- **L'instabilité génomique** : une augmentation du taux de mutations et d'altérations chromosomiques favorise l'évolution clonale et l'adaptation tumorale.
- **L'acquisition d'un phénotype invasif et métastatique** : caractérisée par la perte de l'adhérence cellulaire, l'activation de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et l'invasion des tissus adjacents.

L'ensemble de ces étapes résulte d'une accumulation de mutations contribuant à la genèse des cancers bronchopulmonaires.

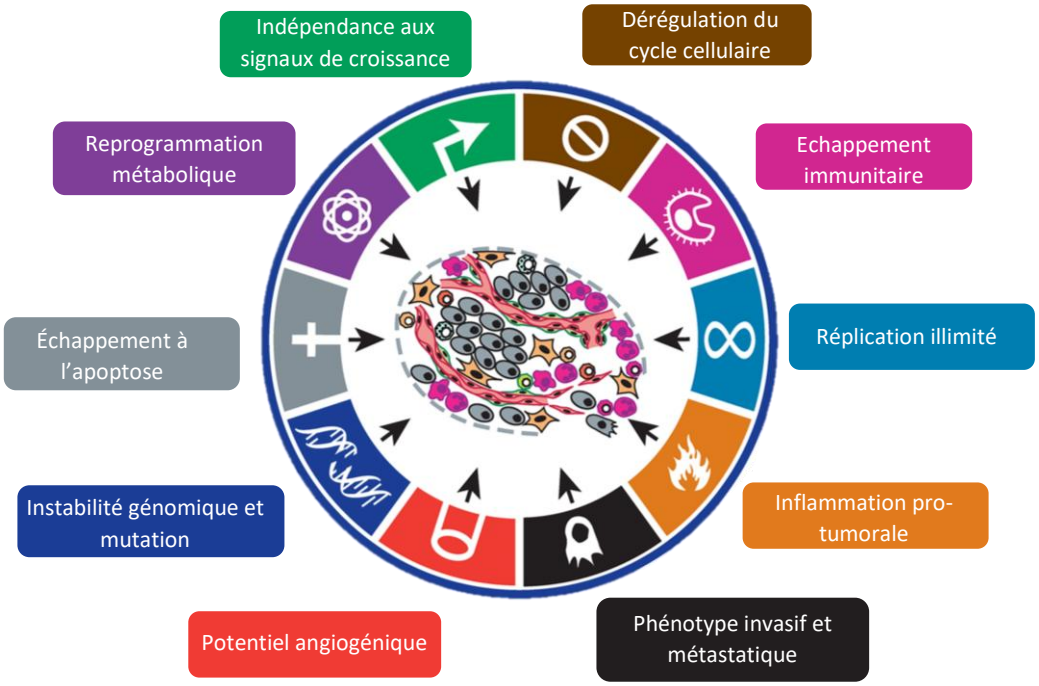



***Figure 3 : Les étapes de la carcinogenèse bronchique (adapté de Hanahan et Weinberg 2011)***

Les altérations moléculaires affectent principalement deux grandes classes de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes sont généralement activés par des mutations gain de fonction ou par amplification génique sur un seul allèle, conférant un caractère dominant à ces altérations. À l'inverse, les gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés par des mécanismes de perte de fonction, nécessitant souvent des altérations bi-alléliques (mutation, délétion, méthylation du promoteur, etc.).

Les **oncogènes** codent pour des protéines intervenant dans des processus cellulaires clés de la progression tumorale, tels que la transduction de signaux mitogènes (notamment pour la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire), la survie cellulaire, la migration, l'invasion, ainsi que la différenciation ou la dédifférenciation cellulaire.
On distingue classiquement sept grandes familles d'oncogènes, en fonction de la nature de la protéine qu'ils codent et de leur position dans les cascades de signalisation cellulaire (Hanahan & Weinberg, 2011; Vogelstein et al., 2013) :

- Facteurs de croissance
- Récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase
- Protéines intracellulaires à activité tyrosine kinase
- Petites GTPases membranaires
- Sérine/thréonine kinases cytoplasmiques
- Protéines régulatrices du cycle cellulaire ou de l'apoptose
- Facteurs de transcription

Cette activation des oncogènes permet aux cellules tumorales d'échapper au contrôle de la prolifération et de répondre de manière autonome à des signaux de croissance.

Les **gènes suppresseurs de tumeurs** codent pour des protéines essentielles au contrôle négatif du cycle cellulaire, à l'induction de l'apoptose, au maintien de l'intégrité du génome, ainsi qu'à la réparation de l'ADN. Ces protéines jouent un rôle de gardiens de la stabilité génomique et de freins physiologiques à la prolifération incontrôlée. Parmi les plus connus figurent :

- *TP53*, régulateur central de la réponse au stress cellulaire et de l'apoptose ;
- *RB (*Retinoblastoma protein), inhibiteur majeur de la transition G1/S *via* le contrôle des facteurs E2F ;
- *PTEN*, antagoniste de la voie PI3K/AKT ;
- *LKB1/STK11*, régulateur du métabolisme et du stress énergétique ;
- *BRCA1/2 (*Breast Cancer 1/2), impliqués dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue.

Cette perte de leur activité inhibitrice permet la levée des points de contrôle du cycle cellulaire, une diminution de l'apoptose, une instabilité génomique accrue et, *in fine*, une facilitation de la transformation maligne.

## 1) L'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance

### 1.1) La famille ErbB et son rôle dans la signalisation oncogénique

La famille des récepteurs tyrosine kinases ErbB (Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog) comprend EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2), ErbB3 et ErbB4. Hormis ErbB3, ces récepteurs possèdent une activité tyrosine kinase. Leur activation par ligand induit une dimérisation, suivie d'autophosphorylations qui recrutent des adaptateurs et déclenchent des voies majeures comme PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MEK/ERK, et JAK/STAT. Des mutations activatrices d'EGFR, affectant son domaine kinase, sont présentes dans ~12 % des CBNPC, souvent à un stade avancé de la carcinogenèse (S. Y. Lee et al., 2010; Barlesi et al., 2016).

### 1.2) KRAS : un oncogène clé de la signalisation MAPK dans le CBNPC

KRAS, membre des petites GTPases RAS, transmet les signaux en aval d'EGFR vers la voie MAPK. Une fois activé, KRAS déclenche la cascade RAF-MEK-ERK, stimulant prolifération, différenciation et survie cellulaire. Des mutations activatrices de KRAS sont retrouvées dans environ 20 % des CBNPC, notamment chez les fumeurs (Pylayeva-Gupta et al., 2011; Jeon et al., 2025).

### 1.3) La voie RAS/RAF/MEK/ERK et les mutations de BRAF

BRAF, kinase de la voie MAPK, ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2), contrôlant l'expression génique impliquée dans la croissance tumorale. Des mutations de *BRAF*, notamment V600E, sont détectées dans environ 2 % des CBNPC (H. Ji, Wang, et al., 2007; Leonetti et al., 2018).

### 1.4) Perte de PTEN et activation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le CBNPC

La voie PI3K/AKT/mTOR est activée par les récepteurs à tyrosine kinase (RTK) ou via RAS. PI3K génère du phosphatidylinositol (3,4,5) -trisphosphate (PIP3), activant AKT (protein kinase B) et mTOR (Mechanistic Target of Rapamycin), régulateurs de la croissance et de la survie cellulaire. Des mutations activatrices de *PIK3CA* sont présentes dans 3–5 % des CBNPC (Sanaei et al., 2022; M. Qiang et al., 2025). PTEN, inhibiteur négatif de cette voie, est fréquemment inactivé (15 % des cas), via mutations, délétion, méthylation ou altérations post-

traductionnelles, favorisant progression tumorale et résistance thérapeutique (Gkountakos et al., 2019).

#### 1.5) Le récepteur Met et son ligand HGF dans les CBNPC

Le récepteur MET, également appelé récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (HGF-R), est une protéine transmembranaire à activité tyrosine kinase exprimée dans les cellules épithéliales bronchiques. Son ligand, le HGF (Hepatocyte Growth Factor), possède des propriétés mitogéniques, stimule de la migration.

Dans le contexte du CBNPC, l'activation anormale de la voie HGF/MET favorise la prolifération tumorale, la migration cellulaire, l'invasion tissulaire, ainsi que l'angiogenèse. Cette activation peut résulter de la surexpression de *MET*, de mutations ou d'amplifications du gène *MET* (Spagnolo et al., 2023; Han et al., 2024)

#### 1.6) Réarrangement du gène ALK

Des réarrangements chromosomiques impliquant *ALK* (notamment EML4::ALK) sont présents dans 4–5 % des CBNPC. La protéine de fusion EML4::ALK active constitutivement les voies PI3K/AKT, MAPK et JAK/STAT, promouvant croissance et survie tumorales (X. Du et al., 2018).

### 2) Dérégulation du cycle cellulaire

#### 2.1) Le gène TP53 : gardien du génome

Le gène *TP53* code la protéine p53, un facteur de transcription central dans le maintien de l'intégrité génomique. Activée en réponse à divers stress cellulaires (hypoxie, dommages à l'ADN, signaux oncogéniques comme c-Myc ou Ras), p53 orchestre l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose (T. Li et al., 2012).

En conditions physiologiques, p53 est maintenue à bas niveau par dégradation protéasomale via HDM2 (Human Double Minute 2). En situation de stress, p53 est phosphorylée, bloquant son interaction avec HDM2 et stabilisant la protéine (Hofmann et al., 2002). p53 s'accumule alors dans le noyau, se lie à des séquences consensus de l'ADN et régule l'expression de gènes impliqués dans :

- Arrêt du cycle cellulaire en G1/S ou G2/M par l'induction de gènes tels que *p21*

- Réparation de l'ADN
- Induction de l'apoptose en cas de dommage irréversible, par l'activation de gènes comme *BAX, PUMA* ou *NOXA*

Dans environ 60 % des CBNPC, *TP53* est inactivé, souvent par perte d'hétérozygotie suivie d'une mutation de l'allèle restant. Ces mutations, le plus souvent faux-sens ou non-sens, conduisent à une perte de fonction ou à un effet dominant négatif (T. Chen et al., 2025). Elles sont particulièrement fréquentes dans les CBNPC EGFR-mutés et associées à un pronostic défavorable (X. Ma et al., 2016; Jiao et al., 2018).

#### *2.2) RASSF1*

Dans 25% des cas des CBNPC, une hyperméthylation du promoteur de *RASSF1* (Ras Association Domain Family Member 1) est observé (de Fraipont et al., 2012). Cette régulation épigénétique induit une répression de l'expression de la protéine suppressive de tumeur RASSF1A en faveur de l'oncogène RASSF1C (Reeves et al., 2013). La perte d'expression de RASSF1A inhibe l'activation de la voie Hippo engendrant l'activation de YAP-1/TAZ (Yes-Associated Protein 1 / Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) conduisant ainsi au développement tumoral (Dubois et al., 2016 ; Keller et al., 2019). RASSF1A est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, son inhibition donne lieu à une prolifération accrue, son rôle sera davantage détaillé par la suite.

### 3) Echappement à l'apoptose

#### *3.1) E2F1*

E2F1 (E2F Transcription Factor 1) est un acteur clé de l'apoptose. Il participe notamment à la régulation de l'épissage alternatif de nombreux gènes pro- ou anti-apoptotiques tel que BCL-X, dont l'épissage peut produire une isoforme pro-apoptotique (BCL-xS) ou anti-apoptotique (BCL-xL), caspases 8 et 9, essentielles à l'initiation de la voie apoptotique extrinsèque et intrinsèque (Merdzhanova et al., 2008). Le rôle de E2F1 dans l'apoptose est aussi induit par c-Myc et est plus ou moins dépend de p53 (Salon et al., 2006).

### 3.2) Bcl2/BAX

Les protéines BAX ((Bcl-2 Associated X protein) pro-apoptotique) et Bcl-2 (anti-apoptotique) régulent la voie intrinsèque de l'apoptose. Leur interaction détermine la sensibilité des cellules à la mort programmée.
La protéine BAX peut former des homodimères BAX-BAX, qui s'insèrent dans la membrane mitochondriale et favorisent la perméabilisation de celle-ci, menant à la libération du cytochrome C et à l'activation des caspases, des hétérodimères BAX-Bcl-2 qui bloque l'apoptose.

Dans les CBNPC, une surexpression de Bcl-2 par rapport à BAX est fréquemment observée. Ce déséquilibre inhibe l'apoptose, favorisant ainsi la survie tumorale et la résistance aux traitements (Brambilla et al., 1996; Alam et al., 2022; Martín et al., 2025).

### 3.3) FasL et Fas récepteur

Le récepteur de la mort cellulaire Fas (Fas Cell Surface Death Receptor ou CD95), activé par son ligand FasL (Fas Ligand), initie la voie extrinsèque de l'apoptose *via* l'activation de la caspase-8. Dans environ 70 % des CBNPC, cette voie est inactivée, principalement en raison d'une hyperméthylation du promoteur du gène Fas, ce qui empêche son expression et permet aux cellules tumorales d'échapper à l'apoptose (Viard-Leveugle et al., 2003).

### 3.4) Myc

La protéine c-Myc, facteur de transcription pro-prolifératif, régule l'expression de gènes du cycle cellulaire, de la synthèse d'ADN et du métabolisme. Il active le complexe CDK2/cycline E, mais peut aussi, en cas de stress oncogénique, induire une apoptose p53-dépendante. Une amplification des gènes *Myc* est présente dans environ 8 % des CBNPC (Brambilla & Gazdar, 2009).

## 4) Potentiel réplicatif illimité

Les télomérases sont des enzymes ribonucléoprotéiques principalement exprimées dans les cellules souches, germinales et progénitrices, mais leur expression est réprimée dans la

majorité des cellules somatiques. Leur fonction consiste à allonger les télomères, structures répétitives de type TTAGGG situées aux extrémités des chromosomes, afin d'en assurer la stabilité chromosomique (Cheng et al., 1989). Dans les cellules somatiques, l'absence d'activité télomérase entraîne un raccourcissement progressif des télomères à chaque division cellulaire. Lorsqu'un seuil critique est atteint, appelé limite de Hayflick, ce raccourcissement est perçu comme une lésion de l'ADN, déclenchant des processus de sénescence ou d'apoptose.

Dans le CBNPC, une réactivation de l'activité télomérase est observée dans environ 80 % des cas, ce qui constitue un mécanisme majeur d'échappement à la sénescence réplicative (Lantuejoul et al., 2004).

### 5) Acquisition du potentiel angiogénique

Le VEGFA constitue le principal médiateur de l'angiogenèse, processus indispensable à la croissance tumorale et à sa dissémination métastatique. Le VEGFA exerce son action par hétérodimérisation, activant diverses voies de signalisation intracellulaire, dont l'expression est fortement induite en condition d'hypoxie (W. Zhang et al., 2015). Ce facteur est impliqué dans le chimiotactisme et la migration des cellules endothéliales, ainsi que dans leur survie, notamment par l'activation des voies PI3K/AKT et MEK/ERK, contribuant ainsi à la formation d'un réseau vasculaire tumoral.
Dans les CBNPC, une expression élevée de VEGFA est généralement corrélée à un pronostic défavorable (P. Zhan et al., 2009).

### 6) L'évasion au système immunitaire

La théorie de la surveillance immunitaire postule que le système immunitaire élimine en permanence les cellules tumorales naissantes, empêchant leur progression (Vajdic & van Leeuwen, 2009). Toutefois, les tumeurs solides qui émergent ont probablement échappé à cette surveillance, soit en évitant la détection, soit en limitant la destruction immunitaire.
La réponse immunitaire contre les tumeurs suit trois étapes clés : (1) l'activation des lymphocytes T, (2) leur infiltration dans la tumeur, et (3) la cytotoxicité dirigée contre les

cellules tumorales. Un dysfonctionnement à l'une de ces étapes peut favoriser l'échappement tumoral.

L'infiltration des lymphocytes T est limitée par des anomalies vasculaires, une matrice extracellulaire (MEC) dense (Peske et al., 2015), et la présence de cellules immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral, telles que les macrophages associés à la tumeur (TAM), les cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et les lymphocytes Treg (Haist et al., 2021; B. Wu et al., 2024).

Parmi les mécanismes d'immunosuppression les plus étudiés, l'axe PD-1/PD-L1 joue un rôle majeur. PD-1 est un récepteur inhibiteur exprimé principalement sur les lymphocytes T activés, mais aussi sur d'autres cellules immunitaires (macrophages, Neutral killer (NK), monocytes, cellules dendritiques). Son ligand, PD-L1, est exprimé par les cellules tumorales, les cellules infiltrant la tumeur, et les cellules présentatrices d'antigènes (Daud et al., 2016; Q. Lin et al., 2023). Leur interaction inhibe la fonction des T $CD8^+$ cytotoxiques, facilitant l'échappement tumoral.

### 7) Inflammation

Les tumeurs solides, y compris les CBNPC, sont fréquemment infiltrées par des cellules immunitaires issues des systèmes inné et adaptatif, révélant un état inflammatoire local (Dvorak, 1986 ; Pagès et al., 2010). L'infiltration peut également favoriser la progression tumorale. Les cellules immunitaires, notamment innées, libèrent des facteurs de croissance, pro-angiogéniques ou anti-apoptotiques, ainsi que des signaux inducteurs de la TEM, contribuant à plusieurs capacités caractéristiques du cancer (Grivennikov et al., 2010; Qian & Pollard, 2010).

L'inflammation peut apparaître dès les premiers stades néoplasiques et produire des espèces réactives de l'oxygène, favorisant l'instabilité génomique et l'évolution clonale(de Visser et al., 2006; Grivennikov et al., 2010). Ainsi, l'inflammation ne se limite pas à une réponse immunitaire, mais agit comme une force promotrice du cancer.

### 8) Instabilité génomique

L'instabilité génomique joue un rôle fondamental dans la progression des CBNPC. Elle découle d'une accumulation de mutations génétiques et/ou d'altérations épigénétiques (Berdasco & Esteller, 2010) favorisant l'expansion clonale de cellules présentant un avantage sélectif (Negrini et al., 2010). Cette instabilité résulte de défauts dans les mécanismes de la détection des dommages, réparation de l'ADN, ou de l'inactivation de gènes gardiens du génome, tels que *TP53*, mais également l'élimination des agents mutagènes (Friedberg et al., 2006; Ciccia & Elledge, 2010). De plus, la perte des télomères et la réactivation de la télomérase contribuent à l'instabilité chromosomique (Artandi & DePinho, 2010).

### 9) Reprogrammation métabolique

Les cellules cancéreuses adoptent un métabolisme particulier connu sous le nom d'effet Warburg, caractérisé par une utilisation préférentielle de la glycolyse aérobie, même en présence d'oxygène (Warburg, 1956). Bien que moins efficace pour produire de l'ATP que la phosphorylation oxydative, cette stratégie permet de détourner les intermédiaires glycolytiques vers des voies biosynthétiques nécessaires à la prolifération cellulaire (Vander Heiden et al., 2009). Cette reprogrammation est favorisée par des oncogènes (RAS, MYC) et la perte de suppresseurs de tumeurs (p53), qui stimulent l'expression de transporteurs de glucose (GLUT1) et d'enzymes glycolytiques (DeBerardinis et al., 2008). L'hypoxie tumorale active les facteurs HIF-1α/2α (Hypoxia-Inductible Factors), renforçant ce profil métabolique (Semenza, 2010).

Certaines tumeurs présentent une coopération métabolique entre cellules hypoxiques, qui sécrètent du lactate, et cellules normoxiques, qui l'utilisent *via* le cycle de Krebs (Kennedy & Dewhirst, 2010).

### 10) Acquisition d'un phénotype invasif et métastatique

#### *10.1) LBK1*

Le gène suppresseur de tumeur *LKB1* (Liver Kinase B1, aussi appelé STK11) joue un rôle fondamental dans les CBNPC. Il intervient dans plusieurs processus clés tels que la

différenciation cellulaire, le contrôle de la croissance tumorale, la régulation du métabolisme énergétique, ainsi que dans l'inhibition de la dissémination métastatique (H. Ji, Ramsey, et al., 2007; Roy et al., 2010). Dans les CBNPC, des mutations inactivatrices de *LKB1* sont observées dans environ 15% des cas, souvent en association avec des mutations de *KRAS*, suggérant une coopération oncogénique (Gill et al., 2011).

La perte d'expression de LKB1 favorise un microenvironnement immunosuppresseur froid induit par l'absence de cellules immunitaires inflammatoire et la présence de cellules immunosuppressives (Koyama et al., 2016).

#### *10.2) MMP*

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des enzymes capables de dégrader les composants de la MEC et de la membrane basale, facilitant ainsi l'invasion tumorale et la métastase. Au-delà de leur rôle mécanique, les MMP libèrent des facteurs de croissance séquestrés dans la MEC, les rendant biodisponibles pour les cellules tumorales (Kessenbrock et al., 2010). Certaines MMP, notamment MMP-2 et MMP-9, sont aussi impliquées dans l'angiogenèse tumorale, en favorisant la migration cellulaire (Webb et al., 2017).

## B. Les différentes étapes de la dissémination métastatique

La formation des métastases constitue un processus complexe et dynamique en plusieurs étapes, incluant : l'invasion, l'intravasation, la survie en circulation, l'extravasation et la colonisation du site secondaire (*Figure 4*). Parmi l'ensemble des cellules tumorales, seules quelques-unes possèdent la capacité d'initier une métastase : il s'agit principalement des cellules souches cancéreuses (CSC). Dotées d'une plasticité élevée, d'une grande capacité d'adaptation et de communication intercellulaire, ces cellules sont aptes à surmonter les différentes difficultés du processus métastatique. Ce phénomène est finement régulé par des facteurs moléculaires, des interactions avec le microenvironnement tumoral, ainsi que par des programmes transcriptionnels spécifiques.

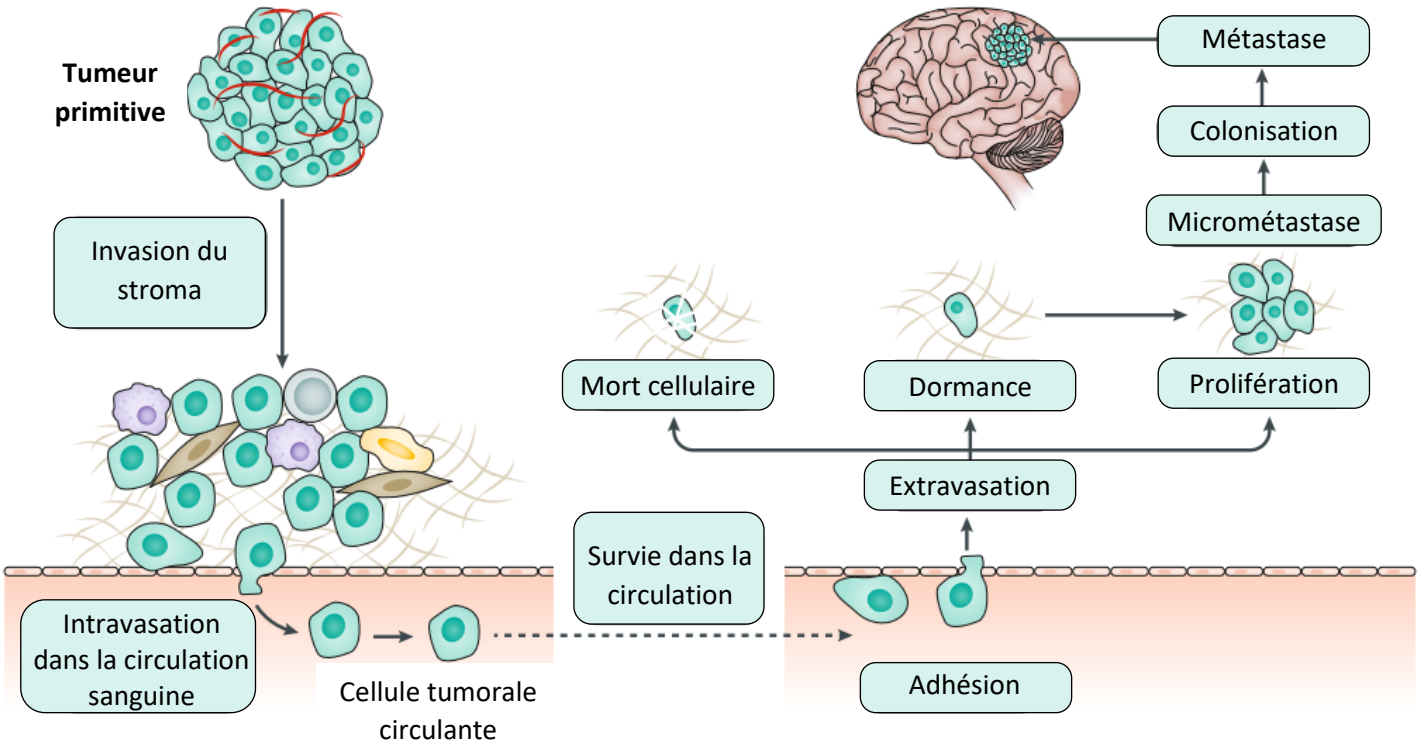



***Figure 4 : Dissémination métastatique de cellules cancéreuses***

*Les métastases cérébrales se développent à la suite de la dissémination dans la circulation sanguine de cellules d'une tumeur primaire dans la microvasculature cérébrale, avec une croissance tumorale ultérieure impliquant des interactions entre la niche microenvironnementale et la tumeur, des cascades neuroinflammatoires et une néovascularisation. Au départ, les cellules tumorales de se détachent de la tumeur primaire et envahissent les tissus environnants, les veinules, les capillaires et le système lymphatique de (intravasation). Les interactions entre les cellules tumorales, les CAF et les cellules immunitaires favorisent la motilité des cellules par l'élimination de la matrice extracellulaire. Une fois dans la circulation, ces cellules tumorales circulantes entament le processus d'extravasation métastatique à partir du système vasculaire. Les cellules des microemboles transitoires ou effectuent un rolling comme es leucocytes. Les métastases cérébrales s'établissent le plus souvent à la jonction entre la matière grise et la matière blanche et dans les bassins versants entre les territoires vasculaires où les cellules tumorales circulantes semblent bénéficier de plus de temps pour franchir la barrière hémato-encéphalique et réussir à s'extraire du système vasculaire. Après avoir été arrêtées et extravasées, la plupart des cellules tumorales meurent plutôt que de former des métastases, tandis certaines restent dormantes sur les sites métastatiques pendant de longues périodes. Elles peuvent parvenir à s'adapter à ce nouvel environnement et reproliférer pour coloniser ce site (adapté de Achrol et al, 2019).*

## 1) Invasion

### 1.1) La transition épithélio-mésenchymateuse

L'invasion est la première étape du processus métastatique, marquant l'évasion des cellules tumorales de leur site d'origine. Elle repose sur une reprogrammation phénotypique des cellules cancéreuses, leur conférant une plasticité accrue. La TEM est un mécanisme essentiel au développement de métastases, permettant aux cellules de perdre leurs caractéristiques épithéliales et d'acquérir un phénotype mésenchymateux, plus mobile et agressif (Gavert & Ben-Ze'ev, 2008). Sur le plan moléculaire, les cellules tumorales augmentent l'expression de facteurs de transcription tels que Snail et TWIST (Twist Family BHLH Transcription Factor 1), perdent leurs marqueurs épithéliaux et les molécules d'adhésion facilitant l'invasion dans les tissus (Lamouille et al., 2014). Ainsi dans les CBNPC, plusieurs voies moléculaires contribuent à l'induction de la TEM, notamment l'axe Snail-N-cadhérine, la voie des HIF et la voie Notch (D. H. Shin et al., 2020; Y. Jiang et al., 2021).

### 1.2) Les modes d'invasion tumorale

L'invasion des tissus par les cellules tumorales se fait selon deux modes principaux sont décrits (Y. Yang et al., 2019) :

- La migration cellulaire individuelle, à l'origine de métastases monoclonales, Dans la migration individuelle, les cellules tumorales acquièrent un phénotype invasif en modifiant leur forme et leur interaction avec les autres cellules et la MEC. Cette migration peut par ailleurs être mésenchymateuse (dépendante de la MEC) ou amiboïde (indépendante de la MEC).
- L'invasion collective, responsable de métastases polyclonales. Les cellules tumorales migrent sous forme de structure cohésives multicellulaires, tout en conservant les adhésion cellule-cellule (Cheung et al., 2013; Y. Yang et al., 2019).

### 2) Intravasation

L'intravasation correspond au processus par lequel les cellules tumorales traversent l'endothélium pour pénétrer dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et rejoindre la circulation systémique.
Ce mécanisme est régulé par des facteurs intrinsèques (TEM, production de protéases) et extrinsèques (neutrophiles pro-tumoraux, CAFs, TAM). Les TAM périvasculaires facilitent l'intravasation via la sécrétion d'EGF, l'activation des MMP-9 et la formation de protrusions riches en actine, augmentant la motilité tumorale (Kai et al., 2016; Williams et al., 2016). Par ailleurs, l'architecture désorganisée et la perméabilité des vaisseaux tumoraux favorisent ce passage (Folarin et al., 2010).

Divers facteurs moléculaires et environnementaux engendrent l'intravasation. Les cellules endothéliales sécrètent CXCL12 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 12), qui attire les cellules tumorales exprimant CXCR4 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 4), activant MMP12 et facilitant l'invasion (Müller et al., 2001). CXCL12 se lie également au récepteur CXCR7 qui inhibe MMP12 mais stimule VEGFA entrainant la formation de néo-vaisseaux tumoraux. Une forte expression de CXCR7 est associée à un potentiel métastatique accru (Burns et al., 2006; Costello et al., 2012). De plus, la voie Notch participe au franchissement endothélial (Gridley, 2001).
La rigidité de la matrice extracellulaire stimule la formation d'invadopodes, favorisant la dégradation et la traversé de la MEC par les cellules tumorales via la sécrétion de MMP-2 et MMP-9 (Kai et al., 2016). Elle favorise aussi la libération de VEGFA, renforçant l'angiogenèse et la lymphangiogenèse propices à la dissémination (Kai et al., 2016).

### 3) Survie des cellules tumorales dans la circulation

Après leur intravasation, les cellules tumorales accèdent à la circulation sanguine, devenant des cellules tumorales circulantes (CTC), présentes sous forme isolée ou en amas multicellulaires (Au et al., 2016; Cheung & Ewald, 2016). Les CTC en agrégats présentent une meilleure résistance aux contraintes circulatoires et sont associées à un pronostic plus défavorable que les formes isolées. Dans cet environnement hostile (stress oxydatif, forces de

cisaillement, surveillance immunitaire), la majorité des CTC est éliminée, rendant le taux de colonisation métastatique extrêmement faible.

Pour survivre, les CTC mobilisent plusieurs stratégies adaptatives :

- **Reprogrammation métabolique** : HIF-1α est activé indépendamment de l'hypoxie, augmentant la captation de glucose et la résistance à l'anoïkis, en lien avec une survie réduite (De Bock et al., 2011).
- **Phénotype mésenchymateux** : Les voies JAK2/STAT3, PI3K/AKT et TGF-β1*(*Transforming Growth Factor Beta 1) soutiennent la TEM, améliorant la survie en suspension (L.-N. Wang et al., 2022).
- **Interactions protectrices** : Les CTC s'associent aux plaquettes et leucocytes, formant un bouclier contre les contraintes mécaniques et le système immunitaire, en particulier contre les cellules NK et les lymphocytes (Palumbo et al., 2005; Placke et al., 2012; Takagi et al., 2013; Mammadova-Bach et al., 2016).

## 4) Extravasation

### *4.1) Processus d'extravasation*

L'extravasation désigne le processus par lequel les CTC quittent la circulation pour coloniser un tissu distant. Ce mécanisme, passif ou actif, constitue une étape clé de la cascade métastatique. Les CTC peuvent s'arrêter dans les capillaires par obstruction (microemboles) ou via des interactions avec l'E-sélectine endothéliale, facilitant leur adhésion et sortie vasculaire (Au et al., 2016, p. 201; Micalizzi et al., 2017).

Plusieurs acteurs favorisent ce processus :

- **Plaquettes** : en formant un bouclier autour des CTC, elles perturbent l'hémostase, favorisent les microthromboses et activent la fibronectine, qui engage les intégrines des CTC et initie le signal d'extravasation (Hamidi & Ivaska, 2018).
- **TGF-β**: libéré par les agrégats, il altère les jonctions endothéliales, facilitant la transmigration.
- **Niches pré-métastatiques** : elles augmentent localement la perméabilité vasculaire, renforçant l'invasion.

Deux types d'interactions régissent cette étape (Leong et al., 2014) :

- **Adhésion à l'endothélium** : les intégrines β3, β1 et CD44 participent à l'ancrage puis à la traversée endothéliale.
- **Interaction avec MEC** : les invadopodes et intégrines des CTC facilitent leur passage à travers la MEC et leur implantation.

Enfin, une modulation phénotypique accompagne l'extravasation, marquée par une hausse de FGF2b (Fibroblast Growth Factor 2b) et d'E-cadhérine, et une baisse de la fibronectine et de la vimentine (Micalizzi et al., 2017).

#### *4.2) Extravasation à travers la BHE*

En l'absence de système lymphatique, la BHE représente la principale voie d'entrée des cellules tumorales dans le cerveau (Winkler, 2017; Boire et al., 2020). L'endothélium cérébral joue ainsi un rôle clé dans la formation des MC, agissant à la fois comme barrière physique et filtre actif.

Composée de cellules endothéliales jointives, de péricytes et d'astrocytes, la BHE oppose une résistance majeure à la dissémination tumorale vers le système nerveux central (Langley & Fidler, 2013). Néanmoins, certaines cellules tumorales parviennent à la franchir en sécrétant des facteurs perturbant son intégrité, tels que Cyclooxygenase-2 (COX-2), CXCL12/CXCR4, cathepsine S, MMP-1, α-cristalline et VEGFA (Bos et al., 2009; Stremitzer et al., 2017).

Ce franchissement implique un dialogue dynamique entre CTC et BHE, rappelant le processus d'extravasation leucocytaire, avec les étapes de roulement, d'adhésion et de transmigration. Des molécules comme CD15 et CD15s interagissent avec la E-sélectine (CD62E) exprimée par l'endothélium cérébral, facilitant l'ancrage des CTC (Jassam et al., 2019) (*Figure 5*).

### 5) Colonisation du site secondaire et croissance

La colonisation représente l'ultime étape du processus métastatique, au cours de laquelle les cellules tumorales disséminées (CTD) s'établissent dans un site secondaire. À ce stade, deux évolutions cellulaires sont possibles (Grant & Ferrer, 2025) :

- **Dormance** : les CTD persistent dans un état quiescent, sans prolifération, échappant ainsi aux traitements anticancéreux.

- **Croissance active** : les CTD réengagent leur cycle cellulaire, prolifèrent et forment une métastase cliniquement détectable.

La dormance constitue une stratégie d'adaptation à un microenvironnement défavorable. Les CTD quiescentes conservent cependant la capacité de se réactiver lorsque les conditions deviennent plus permissives.

La réussite de la colonisation dépend de plusieurs facteurs du site secondaire, notamment l'état immunitaire, inflammatoire, oxydatif et vasculaire. Un microenvironnement permissif est essentiel à la croissance métastatique. Les TAM sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, favorisant ainsi la prolifération tumorale (Bied et al., 2023). L'inflammation secondaire, déclenchée par des lésions vasculaires, des dommages tissulaires et des signaux de stress oxydatif, constitue un facteur clé de l'établissement métastatique (Grant & Ferrer, 2025). Par ailleurs, les CTD doivent affronter une pression immunitaire continue, ainsi que des stress métabolique et hypoxique. Ces contraintes peuvent soit maintenir les cellules en dormance, soit favoriser leur réactivation. Enfin, la propension à la croissance métastatique varie également selon l'organe cible colonisé.

### *5.1) Spécificité de la colonisation cérébrale*

Les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement cérébral régulent la croissance métastatique et les voies de signalisation associées. Dans des modèles murins de métastases cérébrales issues de cancers du sein ou de mélanome, les CTD se localisent préférentiellement dans l'espace périvasculaire, le long de la face adluminale des microvaisseaux, suggérant une cooptation vasculaire reposant sur l'utilisation des vaisseaux existants comme support de croissance (Carbonell et al., 2009; Bentolila et al., 2016).
Une dormance périvasculaire des CTD a été observée dans des modèles murins de métastases cérébrales de cancers du sein, du poumon et de mélanome (Kienast et al., 2010; Winkler, 2017). Des éléments de la BHE, tels que les astrocytes et les macrophages périvasculaires, contribuent à ce phénomène. Les astrocytes sécrètent le HGF, activant la voie MET dans les cellules tumorales, renforçant ainsi leur adhésion à l'endothélium (Xing et al., 2016) (*Figure 5*).

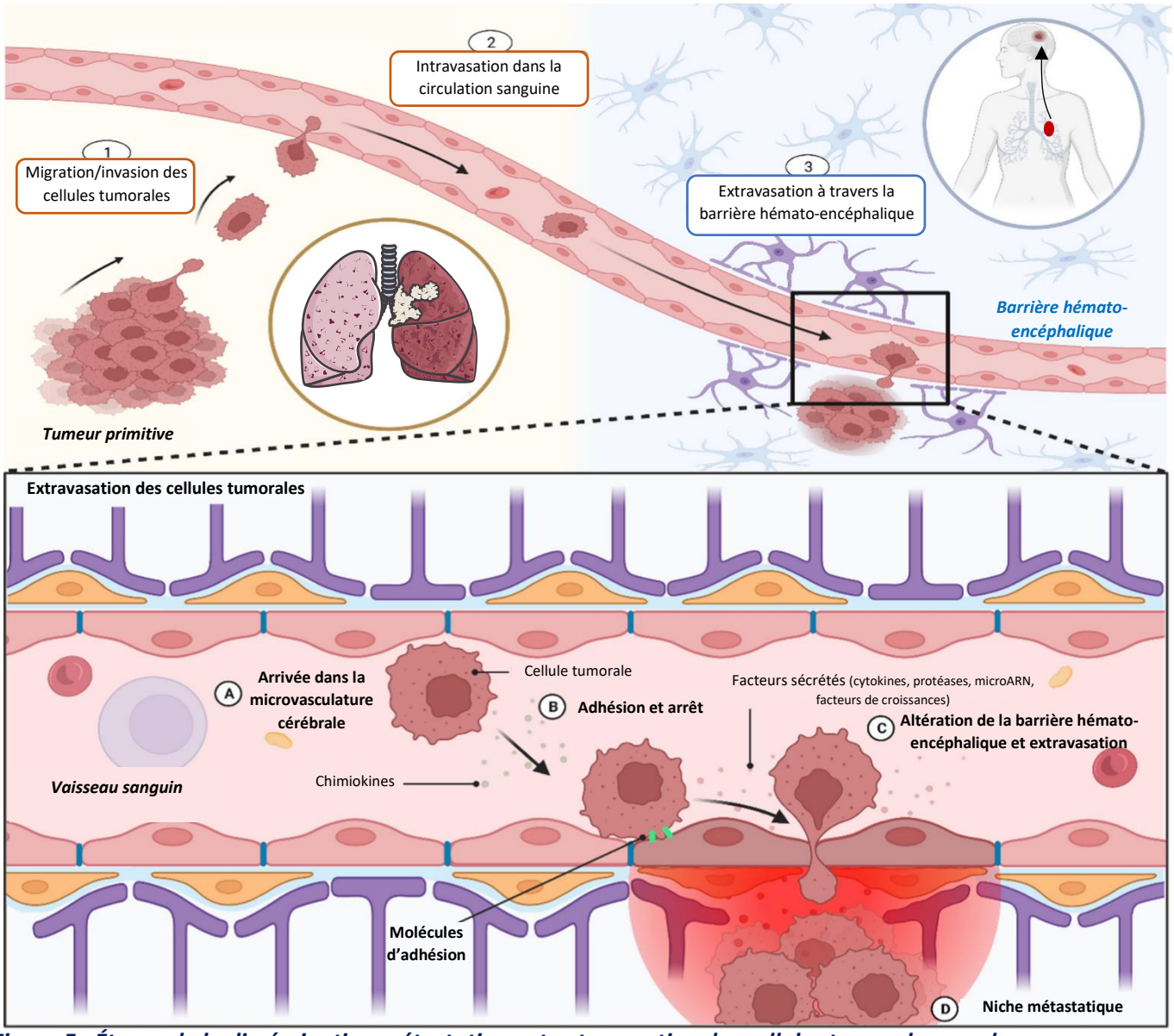



***Figure 5 : Étapes de la dissémination métastatique et extravasation des cellules tumorales vers le cerveau***

*(1) Acquisition de propriétés invasives au site tumoral primaire : Les cellules tumorales acquièrent un phénotype invasif, notamment par le remodelage de la matrice extracellulaire, l'activation de voies de signalisation pro-migratoires, et l'expression de protéases. Ces altérations permettent l'invasion des tissus adjacents et la migration active vers les vaisseaux sanguins environnants.*

*(2) Intravasation et circulation tumorale : les cellules tumorales traversent l'endothélium vasculaire pour entrer dans la circulation sanguine, devenant ainsi des cellules tumorales circulantes (CTC) capables de disséminer à distance.*

*(3) Colonisation du système neurovasculaire : Les CTC peuvent atteindre le système neurovasculaire, en particulier les capillaires cérébraux. Ce processus comprend plusieurs étapes clés :*

*(A)Chimiotaxie et attraction vers l'endothélium cérébral : Des chimiokines sécrétées localement dans le cerveau attirent les cellules tumorales vers la paroi vasculaire cérébrale.*

*(B)Arrêt sur l'endothélium cérébral : L'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium est facilitée par les forces hémodynamiques locales et par l'interaction de molécules d'adhésion spécifiques exprimées à la surface des cellules tumorales et des cellules endothéliales.*

*(C)Perturbation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) : Les cellules tumorales libèrent divers facteurs solubles (protéases, cytokines, VEGF, etc.) qui altèrent l'intégrité de la BHE, augmentant la perméabilité endothéliale et facilitant l'extravasation à travers cette barrière hautement spécialisée.*

*(D)Formation de la niche métastatique périvasculaire : les cellules tumorales s'établissent dans le microenvironnement périvasculaire cérébral, où elles sécrètent des facteurs qui favorisent l'angiogenèse locale, l'immunosuppression, et le remodelage tissulaire, contribuant ainsi à la formation et à la croissance de la niche métastatique cérébrale (adapté de McDonald et al, 2023).*

### 6) La niche pré-métastatique et la niche métastatique

La réussite du processus métastatique repose sur la formation d'une niche pré-métastatique, un microenvironnement préparé à distance par la tumeur primaire, qui favorise l'accueil, la survie et la prolifération des CTC. Cette niche précède l'établissement de la niche métastatique, où les cellules implantées interagissent activement avec leur nouvel environnement pour croître et échapper à l'immunité (Geissler et al., 2023) (*Tableau 2*).

Dans le cas des MC, ce processus comprend trois étapes clés (Y. Wang et al., 2024) (*Figure 6*):

1. La tumeur primaire libère des facteurs solubles et des vésicules extracellulaires modifiant à distance le cerveau.
2. Le microenvironnement cérébral est remodelé pour devenir permissif à l'implantation des CTC.
3. Les CTC colonisent le parenchyme et forment des métastases.

La formation de cette niche pré-métastatique mobilise plusieurs populations immunitaires (de Visser & Joyce, 2023; Grant & Ferrer, 2025) :

- **TAM** : favorisent l'immunosuppression, l'angiogenèse et la formation de micrométastases, via des cytokines et exosomes tumoraux.
- **Neutrophiles** : participent à la suppression immunitaire et à la réactivation de cellules tumorales dormantes.
- **MDSC** : inhibent les lymphocytes T et NK, soutiennent les Treg, l'angiogenèse et la survie des CTC, notamment en conditions d'hypoxie.
- **Lymphocytes T** : la niche est marquée par une augmentation des Treg et une diminution des cellules CD8+, sous l'influence de la voie STAT3.

Ces altérations sont induites par des signaux tumoraux incluant des cytokines, facteurs de croissance et contenus vésiculaires (protéines, microARN). Elles contribuent à l'établissement d'un microenvironnement cérébral favorable à l'implantation des CTC et initient la cascade métastatique.

***Tableau 2 : Caractéristiques et différences entre la niche pré-métastatique et la niche métastatique***

| *Mécanismes clés* | *Niche pré-métastatique* | *Niche métastatique* |
|---|---|---|
| ***Fonction principale*** | Préparation du site distant à l'arrivée des cellules tumorales | Soutien à la croissance et à la résistance des cellules implantées |
| ***Exosomes*** | Transport de miARN (ex: miR-105, miR-122), modulation immunitaire et vasculaire | Évacuation de miARN suppresseurs, adaptation métabolique locale |
| ***Inflammation*** | Recrutement de cellules myéloïdes (MDSC, TAM), cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TGF-β) | Immunosuppression, échappement aux lymphocytes T, recrutement de TAM *via* CCL2 |
| ***Remaniement vasculaire*** | Disruption des jonctions endothéliales (*via* miR-105), activation de l'angiogenèse précoce | Cooption vasculaire, nécroptose des cellules endothéliales |
| ***Modulation de la BHE*** | Ouverture de la BHE *via* VEGFA, IL-23, exosomes tumoraux | Maintien de la perméabilité, infiltration gliale, inflammation chronique |
| ***Facteurs de croissance*** | TGF-β, BMP2, PLGF, VEGFA | Induction de croissance autonome, remodelage du TME |

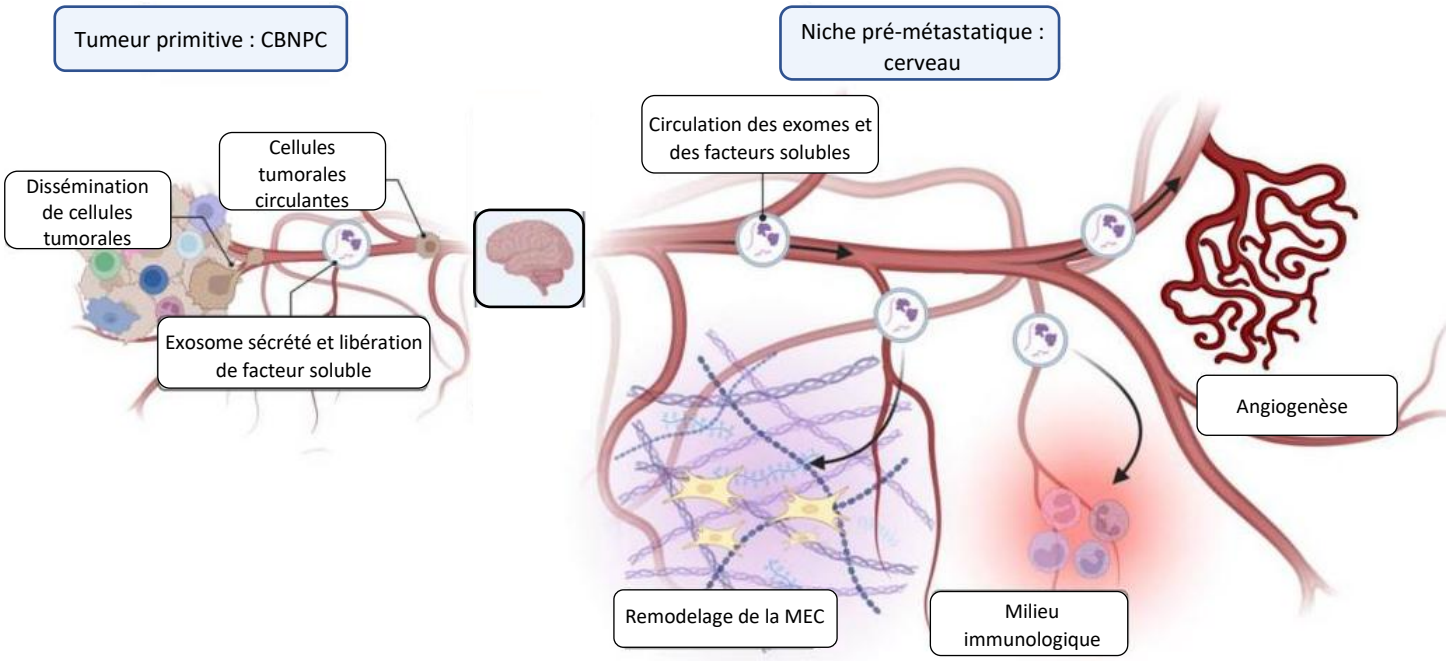



***Figure 6 : Mise en place de la niche pré-métastatique***

*La tumeur primitive envoie des signaux à distance vers l'organe cible, le cerveau, par l'intermédiaire d'exosomes et de facteurs solubles, induisant des modifications locales qui les rendent réceptifs à l'implantation de cellules métastatiques. Ces altérations se concentrent principalement au niveau de la microvascularisation, l'endothélium jouant un rôle central en tant que première barrière contre l'ensemencement des micrométastases. Les caractéristiques clés de la niche pré-métastatique comprennent : le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), l'induction d'une angiogenèse précoce, la modulation directe de l'intégrité et de la perméabilité endothéliales, l'altération du microenvironnement immunitaire local.*

*Ces processus orchestrés facilitent l'accueil et la survie des cellules tumorales circulantes, favorisant ainsi le développement métastatique (adapté de Geissler et al, 2023).*

Outre les cellules immunitaires, d'autres composantes moléculaires et cellulaires participent activement à l'établissement de la niche pré-métastatique cérébrale (*Figure 6*) :

- **VEGFA**, bien connu pour ses effets pro-angiogéniques, augmente également la perméabilité de la BHE via des exosomes tumoraux (Treps et al., 2017; Y. Yang & Cao, 2022).
- **ARN non codants (ARNnc) exosomaux**: certains ARNnc diminuent l'expression des protéines des jonctions serrées, facilitant la perméabilité de la BHE et la dissémination cérébrale dans des modèles de cancers du sein et du poumon (X. Yang et al., 2021).
- **Glutamylation de la β-microtubule par TTLL4** (Tubulin Tyrosine Ligase Like 4) : ce mécanisme favorise l'adhésion des cellules tumorales mammaires à l'endothélium cérébral et augmente la perméabilité de la BHE, contribuant à la formation de la niche (Arnold et al., 2020).
- **Facteur von Willebrand (VWF)** : produit par les cellules endothéliales cérébrales et les plaquettes, le VWF active les plaquettes, favorisant leur agrégation autour des cellules tumorales et leur arrêt dans les capillaires cérébraux. Des dépôts de VWF sont observés dans des régions métastatiques, périmétastatiques, en l'absence de lésions visibles, soulignant son rôle central dans l'initiation de la niche (Robador et al., 2021).

Le système nerveux central contribue également à la formation de la niche. La microglie adopte un phénotype M2 pro-tumoral sous l'effet des vésicules extracellulaires tumorales, promouvant l'immunosuppression, l'extravasation et la colonisation cérébrale (Y. Wang et al., 2024). Les astrocytes sont impliqués dans la déstabilisation de la BHE et dans la progression des MC, ils participent, à un stade plus avancé, au soutien tumoral en produisant des cytokines et en libérant des exosomes favorisant la croissance métastatique (Q. Chen et al., 2016; Doron et al., 2019; Seike et al., 2011; Valiente et al., 2014). Des données *in vitro* montrent qu'une co-culture d'astrocytes et de cellules tumorales bronchiques induit l'expression de gènes de survie tels que *BCL2L1* et *TWIST1*, confirmant leur rôle pro-survie (S.-J. Kim et al., 2011).

La communication paracrine participe au remodelage, les cellules tumorales peuvent transformer des cellules progénitrices neurales en astrocytes *via* des signaux comme le TGF-β et BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein 2)* (Neman et al., 2013). Tous ces processus vont favoriser l'extravasation et la colonisation des CTC au niveau cérébral donnant lieu à la formation de métastases.

# IV – La voie de signalisation Hippo dans les CBNPC

## A. Généralités

### 1) Découverte de la voie Hippo

La voie de signalisation Hippo a été découverte à la fin des années 1990 chez la drosophile comme un régulateur fondamental de la croissance tissulaire. Des criblages génétiques ont notamment permis d'identifier *Warts*, *Hippo*, *Salvador* et *Mob* comme des gènes suppresseurs de tumeurs, dont l'inactivation entraîne une prolifération cellulaire incontrôlée et une augmentation anormale de la taille des organes (Justice et al., 1995 ; Xu et al., 1995). Chez la drosophile tout comme chez les mammifères, la voie Hippo constitue un régulateur essentiel de l'homéostasie cellulaire restreignant la prolifération cellulaire et en favorisant l'apoptose. Ces différents composants sont conservés chez les mammifères, bien que la régulation de la voie y soit plus complexe et intégrée à un réseau de signaux plus étendu. Dans la suite de ce travail, nous nous focaliserons sur la voie Hippo chez les mammifères et de son fonctionnement dans les cellules saines et tumorales.

### 2) Composition et rôles

La voie Hippo peut être divisée en trois groupes de protéines (Z. Meng et al., 2016) (*Figure 7*) :

- **Les protéines régulatrices** : RASSF1A ou des protéines localisées au niveau des jonctions intracellulaires, correspondant à des protéines cytosquelettiques ou membranaires
- **Les kinases au cœur de la voie et leurs adaptateurs** : s'activent les unes les autres par une cascade de phosphorylation. Nous retrouvons les kinases de la famille MST (Mammalian Sterile 20-like Kinase,1/2/3/4/5), les kinases de la familles NDR (LAST1/2((Large Tumor Suppressor 1/2)), NDR1/2 (Nuclear Dbf2-related Kinase 1/2)) et leurs adaptateurs (SAV1(Salvador Homolog 1), MOB1/2 (Mps One Binder Kinase Activator-like 1/2)).
- **Les effecteurs terminaux** : YAP-1 et TAZ, deux co-facteurs transcriptionnels, substrats des kinases NDR.

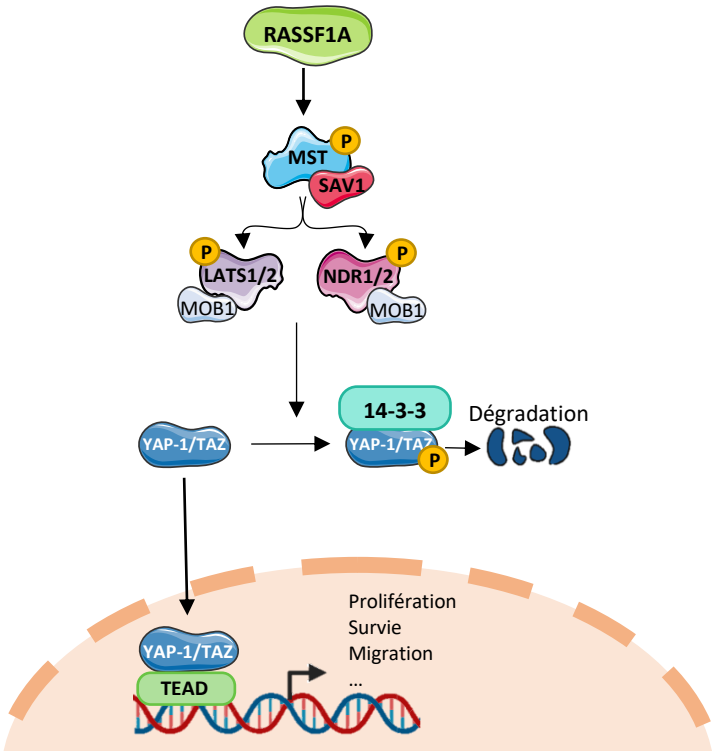



***Figure 7 : Le voie de signalisation Hippo***

*Lorsque la voie Hippo est activée, divers régulateurs comme RASSF1A induisent la phosphorylation des kinases MST1/2/3/4/**5**, qui activent à leur tour LATS1/2 et NDR1/2. Ces dernières phosphorylent les effecteurs terminaux YAP-1 et TAZ, entraînant leur rétention cytoplasmique et leur dégradation. En revanche, lorsque la voie Hippo est inactive**,** YAP-1/TAZ ne sont pas phosphorylés, peuvent transloquer dans le noyau, s'associer à des cofacteurs de transcription tels que TEAD, et induire la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la survie cellulaire, la migration et la TEM (d'après Meng et al, 2016).*

La voie Hippo est essentielle au bon développement des organes et à l'établissement des épithéliums. Lors de l'organogenèse, les kinases au cœur de la voie sont inactives permettant aux effecteurs terminaux YAP-1/TAZ non phosphorylés d'être transloqués dans le noyau, où ils interagissent avec des facteurs de transcription tel que TEAD (Transcriptional Enhanced Associate Domain) induisant ainsi la transcription de leurs gènes cibles impliqués dans la prolifération, la croissance cellulaire et l'inhibition des voies apoptotiques (Z. Meng et al., 2016). Une fois les tissus différenciés, les régulateurs de la voie sont activés et activent les kinases MST1/2/3/4/5, qui font de même avec LATS1/2 ou NDR1/2. Ces dernières phosphorylent à leur tour YAP-1/TAZ amenant à leur séquestration cytoplasmique par des protéines telles que la protéine 14-3-3 ou des protéines situées au niveau des jonctions

cellulaire et à leur dégradation par la voie du protéasome. La prolifération cellulaire est, de ce fait, arrêtée (Z. Meng et al., 2016). Une mauvaise régulation de la voie entraîne donc une prolifération aberrante des cellules.

## 3) Mécanismes de régulation de la voie Hippo

### *3.1) La polarité et l'adhésion cellulaire*

Les cellules épithéliales établissent des jonctions intercellulaires (notamment les jonctions serrées et adhérentes) qui agissent comme des plateformes de signalisation pour la voie Hippo régulant ainsi l'activité de YAP-1/TAZ (*Figure 8*).

Divers complexes de polarité cellulaire, modulent l'activité de YAP-1/TAZ par des mécanismes dépendants ou non de la voie Hippo :

- La protéine **Scribble** (SCRIB) interagit avec MST1/2 activant LATS1/2 et inhibant YAP-1/TAZ. La relocalisation cytoplasmique de SCRIB stimule l'activité de YAP-1/TAZ dans les cancers du sein (Skouloudaki et al., 2009).
- **NF2** (Neurofibromin 2) peut aussi recruter directement LATS1/2 à la membrane plasmique pour son activation (F. Yin et al., 2013).
- Des protéines apicales comme **Crumbs** (Crb) ou **PTPN14** inhibent YAP-1/TAZ par interaction directe (Szymaniak et al., 2015).
- Les protéines jonctionnelles **PALS1** (Protein Associated with Lin Seven 1), **PATJ** (Pals1-associated Tight Junction Protein), **l'E-cadhérine** et l'angiomotine **(AMOT)** qui favorisent la rétention cytoplasmique de YAP-1/TAZ lors d'une forte densité cellulaire (Moleirinho et al., 2017 ; Tóth et al., 2025). Les molécules d'adhésion cellulaire jouent un rôle de suppresseurs de tumeurs *via* l'inhibition de YAP-1/TAZ.
- **PARD3** (Partitioning Defective 3 Homolog) favorise l'activation de LATS1, réprimant TAZ (X.-B. Lv et al., 2015). L'activité de YAP-1/TAZ est faible dans les cellules épithéliales différenciées mais élevée dans les progéniteurs tissulaires (Camargo et al., 2007; Cai et al., 2010), suggérant une régulation médiée par différentes voies selon le contexte.

La polarité cellulaire est un signal clé en amont de la voie Hippo, impliquée dans le contrôle de la taille des organes mais également dans la tumorigenèse.

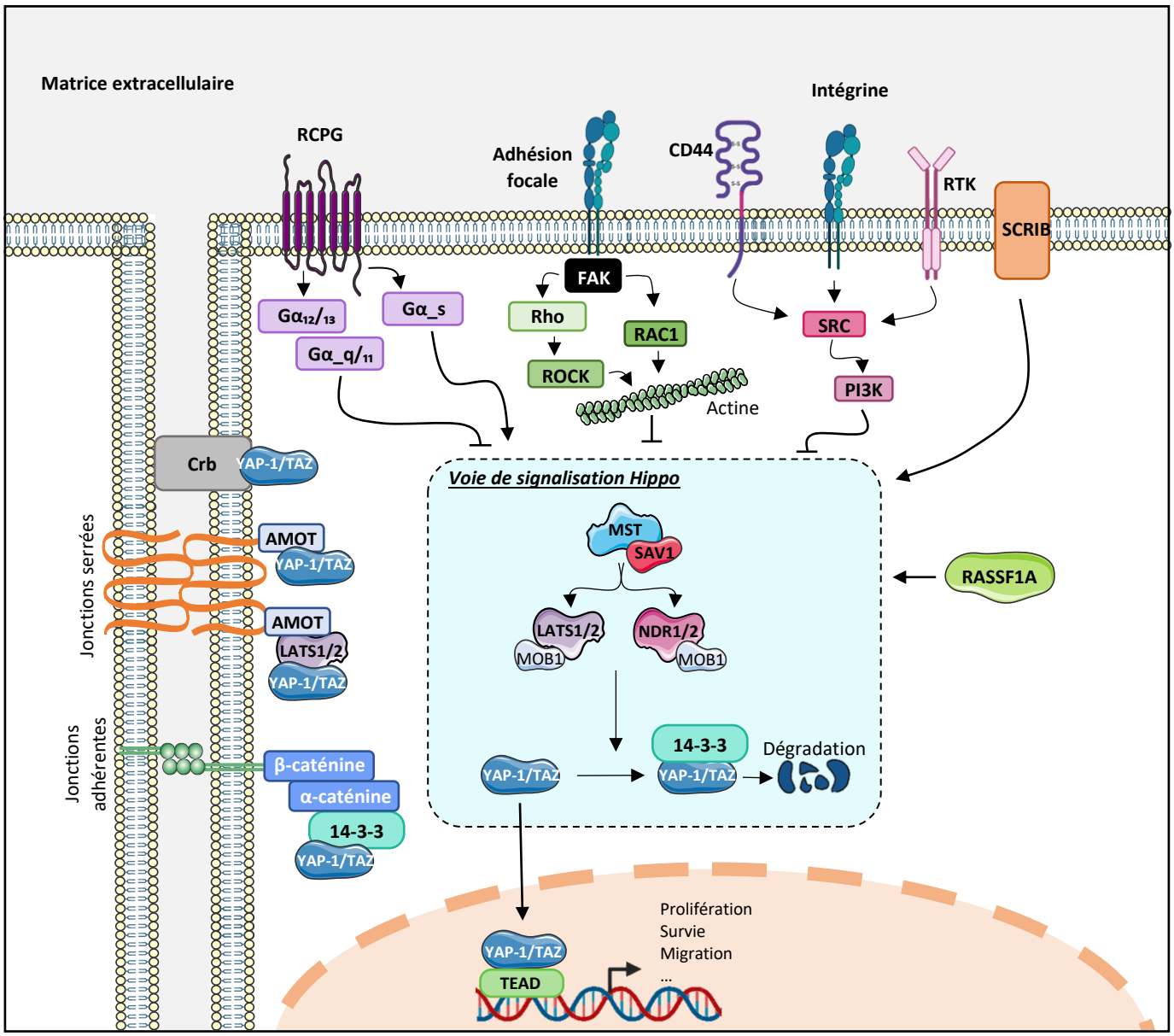



***Figure 8 : Régulation de la Voie Hippo***

*Le cœur de kinase de la voie Hippo (encadré bleu) est finement modulé par divers signaux provenant de la cellule et de son microenvironnement. Les complexes de polarité cellulaire tels que CRUMB (Crb) et Scribble (SCRIB), ainsi que les jonctions adhérentes (via la β-caténine et l'α-caténine) et les jonctions serrées (via AMOT), contribuent à la séquestration cytoplasmique de YAP-1/TAZ, inhibant leur activité transcriptionnelle.*

*Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) peuvent activer ou inhiber la voie Hippo. De plus, la voie est sensible aux signaux mécaniques et à la dynamique du cytosquelette. Les forces de traction transduites par les adhésions focales activent FAK et les GTPases Rho et Rac1, remodelant le cytosquelette d'actine et inhibant la voie Hippo. Les intégrines, en réponse à la matrice extracellulaire, activent Src, ce qui réprime également la signalisation Hippo.*

*Enfin, la protéine d'échafaudage RASSF1A favorise l'activation des kinases MST1/2/3, entraînant l'inhibition de YAP-1/TAZ.*

### 3.2) Forces mécaniques et cytosquelette

Les cellules des organismes multicellulaires réagissent aux contraintes mécaniques de leur microenvironnement, notamment la MEC et les interactions cellule-cellule. Ces signaux physiques modulent la transcription génique, orchestrant des processus comme la prolifération, la différenciation, la morphogenèse et la mort cellulaire (Bissell & Barcellos-Hoff, 1987). Parmi les acteurs clés, YAP-1 et TAZ se démarquent par leur sensibilité aux variations mécaniques, leur activité et leur localisation étant finement contrôlées par la cellule et son environnement (*Figure 8, Figure 9*).

**Densité cellulaire et inhibition de contact :**

L'inhibition de contact, observée à haute densité cellulaire, est un mécanisme crucial activant la voie Hippo, conduisant à l'activation des kinases LATS1/2 et par conséquent à l'inactivation de YAP-1/TAZ (B. Zhao et al., 2007). Bien que les mécanismes précis impliquent des protéines aux jonctions cellulaires comme AMOT qui interagit avec le cytosquelette *via* NF2 (Y. Li, Zhou, et al., 2015), et la trans-dimérisation de l'E-cadhérine qui active la cascade MST1/2–LATS1/2 *via* α/β-caténine, Kibra et Merlin (N.-G. Kim et al., 2011), la réorganisation du cytosquelette d'actine joue un rôle sous-jacent dans l'établissement et la perception de la densité cellulaire.

**Forme cellulaire, actine et rigidité de la MEC :**

L'étirement cellulaire ou l'augmentation de la surface d'étalement entraîne la translocation nucléaire de YAP-1/TAZ et la prolifération cellulaire. Ce processus implique la dynamique du cytosquelette d'actine, notamment la polymérisation de la F-actine et la formation de fibres de stress, qui sont influencées par la rigidité de la MEC et la forme cellulaire(Dupont et al., 2011; Wada et al., 2011; Aragona et al., 2013). Une faible rigidité de la MEC ou une forte confluence cellulaire inhibe YAP-1/TAZ en réduisant l'activité de RhoA, altérant ainsi la forme cellulaire et la tension du cytosquelette (Dupont et al., 2011; Driscoll et al., 2015). L'attachement à la matrice *via* des intégrines active également YAP-1 par les voies Rho-GTPase ou FAK (Focal Adhesion Kinase )–Src–PI3K (B. Zhao et al., 2012; N.-G. Kim & Gumbiner, 2015), tandis que le détachement cellulaire induit leur inactivation et l'anoïkis, dépendante de LATS (B. Zhao et al., 2012).

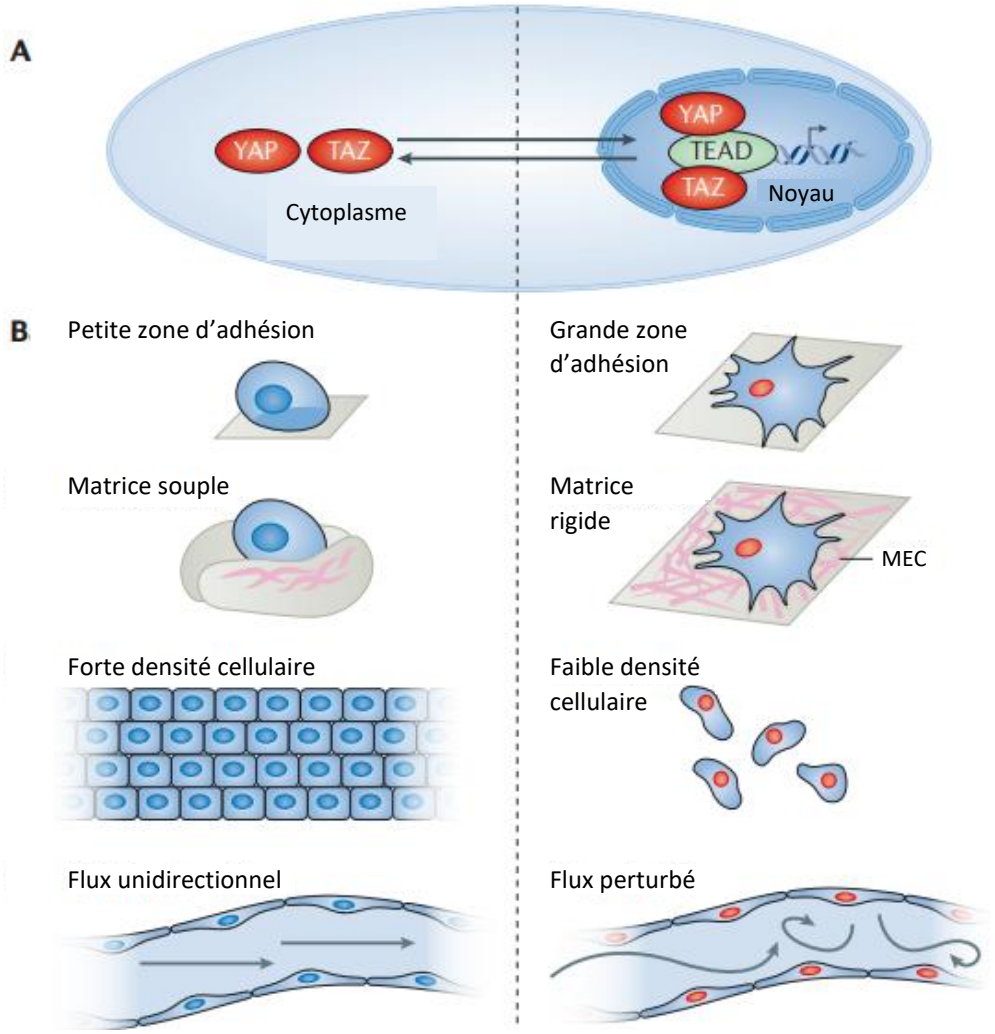



***Figure 9 : Influence des stimuli mécaniques sur la localisation subcellulaire de YAP-1/TAZ***

*(A) En réponse à un stress mécanique (rigidité de la matrice, étirement, tension cellulaire), YAP-1 et TAZ se transloquent dans le noyau, où ils interagissent avec les facteurs de transcription TEAD, induisant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie et la migration cellulaire.*

*(B) Schéma illustrant l'impact de différents paramètres mécaniques et topographiques (rigidité de la matrice extracellulaire, géométrie cellulaire, confluence) sur l'activité de YAP-1/TAZ :*

*À gauche, des conditions mécaniquement permissives faibles (matrice souple, cellules peu étirées ou en forte confluence) induisent une inhibition de YAP-1/TAZ et leur rétention cytoplasmique.*

*À droite, des conditions de rigidité accrue ou d'étalement cellulaire favorisent la localisation nucléaire et l'activation transcriptionnelle de YAP-1/TAZ (visualisées par la coloration nucléaire en rouge) (adapté de Panciera et al, 2017).*

**Forces de cisaillement :**

Des forces comme le cisaillement exercé par le flux de fluide, l'étirement ou la courbure épithéliale, modulent l'activité de YAP-1/TAZ : ces signaux participent à l'homéostasie vasculaire, à la réparation tissulaire et à la croissance régénérative ainsi qu'à la différenciation endothéliale (Aragona et al., 2013; K. M. Kim et al., 2014; Rauskolb et al., 2014; Sabine et al.,

2015). Le type de flux influence différemment leur activation : le cisaillement laminaire unidirectionnel, de nature athéroprotectrice, inhibe YAP-1/TAZ, tandis que le cisaillement oscillatoire, associé à des réponses pro-inflammatoires et prolifératives, les maintient actifs (K.-C. Wang et al., 2016; L. Wang et al., 2016).

Ce contrôle repose sur la signalisation en aval des intégrines *via* Gα13 et Rho, et peut être modulé par des inhibiteurs de Rho comme les statines. De plus, YAP-1 peut être activé de manière indépendante de LATS1/2 par la réorganisation du cytosquelette d'actine, même en présence de flux laminaire (Nakajima et al., 2017). Le stress mécanique favorise la migration et la division des cellules cancéreuses en activant YAP-1/TAZ, suggérant leur implication dans la dissémination tumorale *via* les systèmes vasculaires et lymphatiques (H. J. Lee et al., 2017)

### *3.3) Facteurs solubles*

**Régulation de YAP-1/TAZ par les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) :**

Les RCPG constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires chez les mammifères et représentent une interface majeure entre les signaux hormonaux et la voie Hippo. Les ligands LPA (lysophosphatidic acid) et S1P (sphingosine-1-phosphate) ont été identifiés comme les premiers activateurs diffusibles de YAP-1/TAZ, agissant *via* leurs récepteurs RCPG pour inhiber LATS1/2 et promouvoir l'activité nucléaire de YAP-1/TAZ (F.-X. Yu et al., 2012).

La nature du couplage des RCPG aux différentes sous-unités Gα détermine l'issue de la signalisation (*Figure 8*) :

- Les récepteurs couplés à $G\alpha_{12}/_{13}$, $G\alpha q/_{11}$ ou Gαi/o (par exemple, les récepteurs de la thrombine, du LPA, de l'angiotensine II ou de l'œstrogène) induisent l'activation de YAP-1/TAZ (Miller et al., 2012; F.-X. Yu et al., 2013; X. Zhou et al., 2015).
- À l'inverse, les RCPG couplés à Gα_s, activés notamment par le glucagon ou l'adrénaline, suppriment YAP-1/TAZ *via* l'activation de LATS1/2 par la protéine kinase A (PKA) (Yu et al., 2013).

Ces effets sont médiés par les Rho-GTPases et la dynamique du cytosquelette de F-actine, qui constituent un relais essentiel entre la signalisation RCPG et la voie Hippo (F.-X. Yu et al., 2012; R. Gong et al., 2015). Des altérations de cette régulation, telles qu'une expression aberrante des RCPG ou des mutations des protéines G, peuvent conduire à une activation pathologique

de YAP-1/TAZ, notamment dans certains cancers, comme le cancer du sein *via* le récepteur GPER (X. Feng et al., 2014; X. Zhou et al., 2015).

**Facteurs solubles indépendants des RCPG :**

Plusieurs facteurs de croissance et cytokines activent également YAP-1/TAZ par des voies indépendantes des RCPG. Parmi eux, l'IL-6 (Interleukin 6) favorise la phosphorylation de YAP-1 sur des résidus tyrosine *via* les kinases Src et Yes, facilitant sa stabilisation et sa translocation nucléaire, un mécanisme impliqué dans la régénération intestinale (H. W. Park et al., 2015).
De même, le VEGFA, par l'intermédiaire des voies PI3K/MAPK, active YAP-1 lors de l'angiogenèse tout en inhibant LATS1/2 (Azad et al., 2018). D'autres facteurs, tels que TGF-β**,** EGF**,** insuline, et BMP, ont également été identifiés comme modulateurs de la voie Hippo (Miranda et al., 2017; Sorrentino et al., 2017; Azad et al., 2018).

**Interaction entre la voie Hippo et la signalisation Wnt :**

Une communication fonctionnelle existe entre la voie Hippo et la signalisation Wnt, deux régulateurs clés de la croissance et du développement tissulaire (Piccolo et al., 2014). En particulier, les ligands Wnt5a/b activent YAP-1/TAZ *via* les récepteurs Frizzled (RCPG de classe F), en stimulant l'axe $G\alpha_{12}/_{13}$–Rho–LATS, ce qui est essentiel pour la différenciation, la migration cellulaire et l'inhibition de la voie Wnt/β-caténine (Anastas & Moon, 2013; H. W. Park et al., 2015).

### *3.4) Signaux de stress cellulaires*

De nombreuses études ont mis en évidence l'interconnexion complexe entre la voie Hippo et divers types de stress cellulaires, notamment énergétique, osmotique, hypoxique et lié au réticulum endoplasmique (RE), suggérant une intégration fine entre l'état métabolique cellulaire et les mécanismes de contrôle de la croissance (Camargo et al., 2007; J. Dong et al., 2007).

**Stress métabolique et nutritionnel :**

Le stress énergétique, tel que la privation de glucose ou l'activation AMPK (AMP-activated Protein Kinase), inhibe YAP-1/TAZ *via* phosphorylation directe (Ser94 de YAP-1) ou indirecte

par LATS1/2 activée par AMOTL1 (DeRan et al., 2014; J.-S. Mo et al., 2015). De plus, la voie du mévalonate, *via* la production de dérivés isoprénylés nécessaires à l'activité des GTPases Rho, conditionne la localisation et l'activation de YAP-1/TAZ (Sorrentino et al., 2014).

La biosynthèse des hexosamines, dérivées du métabolisme du glucose, régule YAP-1 par O-GlcNAcylation, inhibant sa phosphorylation par LATS1/2 et favorisant ainsi son activité transcriptionnelle. L'OGT (N-acétylglucosamine transférase O-liée), responsable de cette modification, est une cible transcriptionnelle de YAP-1, suggérant une boucle de rétrocontrôle positive (Artinian et al., 2015; J.-S. Mo et al., 2015; W. Wang et al., 2015).

**Stress hypoxique :**

En hypoxie, l'E3 ubiquitine ligase SIAH2 induit la dégradation de LATS2 et la stabilisation de YAP-1/TAZ, lesquels interagissent avec HIF-1α et HIF-2α, renforçant leur activité transcriptionnelle en conditions tumorales (B. Ma et al., 2015). La signalisation du TGF-B induit aussi une dégradation de LATS2 dans les cellules tumorales du sein en hypoxie, renforçant l'activation de YAP-1 (B. Ma et al., 2016).

**Stress osmotique :**

Le stress osmotique déclenche initialement une activation nucléaire de YAP-1 *via* la kinase NLK (Nemo-like Kinase), avant d'induire une inhibition de l'activité YAP-1/TEAD et l'activation de LATS1/2 (A. W. Hong et al., 2017). De manière similaire, le stress du RE active transitoirement YAP-1 par la voie ERK–eIF2α, avant une inhibition retardée liée à l'intensité et la durée du stress (Panda et al., 2022; H. Wu et al., 2015).

**Stress oxydatif :**

En réponse au stress oxydatif, MST1/2 sont activées, inhibant alors YAP-1. Toutefois, YAP-1 peut interagir avec le facteur FOXO1 (Forkhead Box O1) pour promouvoir l'expression de gènes antioxydants tels que la catalase et la superoxyde dismutase à Manganèse, atténuant le stress oxydatif (Shao et al., 2014). YAP-1 et TAZ apparaissent comme des intégrateurs clés des signaux métaboliques et de stress, orchestrant les réponses adaptatives de survie et de croissance aussi bien dans les cellules saines que tumorales.

## B. Voie Hippo et carcinogenèse bronchique

### 1) Recensement des dérégulations de la voie Hippo dans les cancers bronchiques

De par son caractère suppresseur de tumeur, les altérations de la voie Hippo sont associées à un risque accru de formation de tumeur. Souvent dérégulée dans les cancers, elle conduit à une activation aberrante des cofacteurs transcriptionnels YAP-1/TAZ avec une implication prédominante de YAP-1 dans les CBNPC (Janse van Rensburg & Yang, 2016).

Dans les CBNPC, plusieurs anomalies de la voie Hippo ont été identifiées. Une hyperméthylation du promoteur *RASSF1* est observée dans environ 25% des cas de CBNPC (de Fraipont et al., 2012). Cette régulation épigénétique engendre une perte d'expression de la protéine suppressive de tumeur RASSF1A au profit de l'isoforme RASSF1C, qui possède, elle, un caractère oncogénique (Reeves et al., 2013). Le déficit de RASSF1A facilite d'une part la communication intracellulaire des cellules tumorales par la formation de « tunneling nanotube » (TNT) permettant l'échange de divers composés intracellulaires (Dubois et al., 2016). Ces TNT renforcent le potentiel invasif des cellules de CBNPC (Roehlecke & Schmidt, 2020; Melwani & Pandey, 2023). La perte de RASSF1A induit également l'activation de YAP-1 et TAZ. En effet, dans les cellules bronchiques immortalisées HBEC-3 déplétées pour RASSF1A, l'inactivation de la cascade de kinases de la voie Hippo engendre une activité accrue de YAP-1 (Dubois et al., 2016). Bien que le cœur de la voie Hippo ne soit pas actif, une augmentation de l'activité de la kinase NDR2 est observée dans les cellules de CBNPC dépourvues de RASSF1A. De plus, NDR2 inhibe la protéine RhoB en phosphorylant son échangeur de GTP, GEF-H1, le rendant inactif. Cette inhibition permet la translocation nucléaire de YAP-1 et son activité (Keller et al., 2019). L'activation de NDR2 induit également des défauts de cytokinèse contribuant au développement tumoral (Keller et al., 2019). L'implication de NDR2 dans la carcinogenèse sera détaillée dans une partie ultérieure.

Indépendamment du statut de *RASSF1*, une inhibition de MST1/2 peut être également observée dans les CBNPC. Dans un modèle murin de cancer bronchique induit par une mutation de *KRAS*, la perte de MST1/2 favorise le développement tumoral par l'augmentation de l'expression de PKM2 (Pyruvate Kinase M2), un régulateur métabolique (Singh et al., 2020).

De plus, la protéine MISP (Mitotic spindle positioning protein) interagit avec MST1/2, empêchant leur homodimérisation et leur autophosphorylation induisant l'activation de YAP-1 (F. Zhang et al., 2025). En outre, dans les CBNPC, la NF2 est souvent réduite ce qui entraine une diminution de l'expression de MST1/2 et de LATS1 (X. Li et al., 2024).

Les kinases LATS1/2 sont également restreintes dans les CBNPC, tant au niveau de leur expression que de leur activation. L'expression de LATS2 combinée à celle de CADM1 est un facteur de bon pronostic (Ito et al., 2019). Toutefois, divers mécanismes l'inhibent : l'ARN long non codant MACC1-AS1 qui favorise la déstabilisation de LATS1/2 dans les cellules souches cancéreuses bronchiques (X. Wang et al., 2020) et l'inhibine βA, un facteur de croissance, qui empêche l'activation de LATS1/2 (Y. Zhang et al., 2021). Ces deux processus activent ainsi YAP-1.

La kinase NDR1 est aussi réprimée dans les CBNPC. La protéine ZSWIM1 (Zinc Finger SWIM-type Containing 1), dont l'expression est augmentée dans les CBNPC par rapport au tissu sain, induit une inhibition de NDR1 favorisant l'activité MEKK2/ERK1/2 (X. Gao et al., 2023).

De manière générale, l'altération des régulateurs et des kinases de la voie Hippo (sauf NDR2) induit l'augmentation de l'activité de YAP-1 et TAZ. Cette activation favorise la survie, la prolifération cellulaire et procure aux cellules tumorales un phénotype migratoire et invasif permettant leur dissémination dans l'organisme et la formation de métastases (Dubois et al., 2016; Janse van Rensburg & Yang, 2016; Keller et al., 2019) (*Figure 10*). L'implication de YAP-1 dans le développement et la progression des CBNPC a été démontré dans divers contextes expérimentaux. Par exemple, chez la souris nude, l'injection en percutanée dans le ventricule de cellules dérivant de CBNPC ayant subies une inhibition de YAP-1 entraine une diminution des capacités métastasiques de ces cellules, démontrant l'importance de YAP-1 et de sa suractivation dans la formation de métastases (P.-C. Hsu et al., 2018).

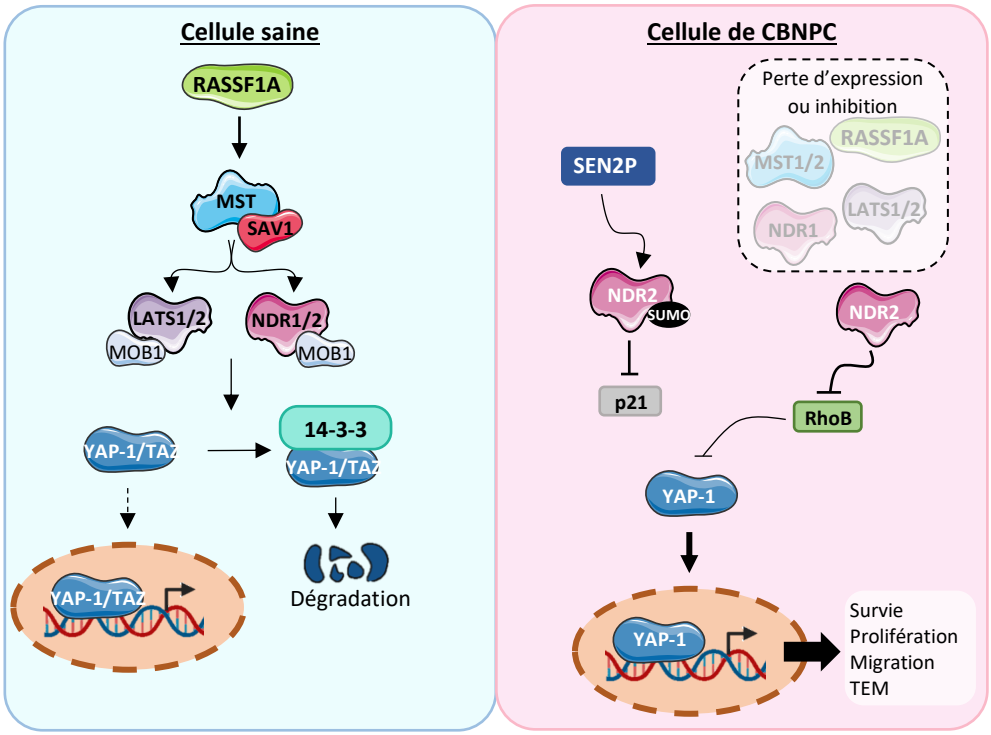



***Figure 10 : Régulation de la voie Hippo dans les cellules saines et tumorales du CBNPC***

*Dans les cellules saines, la voie Hippo est activée par la protéine RASSF1A, un suppresseur tumoral clé. RASSF1A induit une cascade de phosphorylations impliquant les kinases MST1/2/3, qui activent ensuite LATS1/2 et NDR1/2. Ces dernières phosphorylent les coactivateurs transcriptionnels YAP-1 et TAZ, entraînant leur rétention cytoplasmique et leur dégradation par le protéasome, limitant ainsi la prolifération cellulaire. Dans les CBNPC, une perte d'expression ou une inhibition de RASSF1A, MST1/2, LATS1/2 et NDR1 est fréquemment observée, ce qui favorise l'accumulation nucléaire de YAP-1/TAZ et leur activité transcriptionnelle oncogène.*

*Cependant, NDR2 reste exprimée dans ces cellules tumorales. Activée par SUMOylation via SENP2, NDR2 inhibe l'expression de p21 favorisant la prolifération. Par un autre mécanisme, NDR2 inhibe RhoB, contribuant ainsi à l'activation de YAP-1 et à la survie, prolifération, migration cellulaire et la TEM.*

## 2) Place des dérégulations de la voie Hippo dans la prolifération et l'instabilité génomique des cellules de cancers bronchiques

### *2.1) RASSF1A : un régulateur du cycle cellulaires*

RASSF1A est une protéine suppresseur de tumeur dont l'expression et la localisation varient selon les phases du cycle cellulaire (Shivakumar et al., 2002; Rong et al., 2004; Ahmed-Choudhury et al., 2005; Dallol et al., 2007). Sa dynamique subcellulaire, de la prophase à la cytokinèse, lui confère une fonction de régulateur influençant plusieurs acteurs clés de la progression du cycle (*Figure 11*).

- **Phase G1/S** : RASSF1A freine la transition en inhibant l'accumulation de cycline D1 *via* la répression de la kinase JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Shivakumar et al., 2002), et bloque la synthèse de cycline A2 (Ahmed-Choudhury et al., 2005).
- **Phase G2** : RASSF1A induit un arrêt du cycle *via* l'inhibition de p27 et β-TRCP, entraînant l'accumulation de cycline A2 (Rong et al., 2004; Whitehurst et al., 2008).
- **Mitose** : La dégradation de RASSF1A par les complexes ubiquitine ligases SCF E3 ou CUL4A E3 permet l'entrée en mitose (M. S. Song et al., 2008). En prométaphase, elle interagit avec MAP1S (Microtubule-associated protein 1S) pour bloquer APC/Cdc20 (Rong et al., 2007; Chow et al., 2012). La phosphorylation par Aurora-A déclenche sa dégradation (Rong et al., 2007), tandis qu'en télophase, Aurora-B favorise la cytokinèse *via* le recrutement de la syntaxine 16 (S. J. Song et al., 2009).

La perte d'expression ou l'inactivation de RASSF1A entraîne une mitose précipitée, accompagnée de défauts majeurs de cytokinèse tels que la formation de cellules binucléées ou interconnectées (Dallol et al., 2007 ; Keller et al., 2019). Ces anomalies sont probablement liées à une dérégulation des Rho GTPases (Dubois et al., 2016) ou encore à des perturbations de la dynamique des microtubules (Richter et al., 2009). L'interaction directe entre RASSF1A et les microtubules est cruciale pour une ségrégation chromosomique fidèle (Dubois et al., 2019).

La perte de RASSF1A favorise donc l'instabilité génomique, la tétraploïdie et l'aneuploïdie, événements considérés comme précoces dans le processus de transformation maligne (Giam

& Rancati, 2015). Ainsi, la fonction suppresseur de tumeur de RASSF1A repose en grande partie sur sa capacité à maintenir l'intégrité du cycle cellulaire (Donninger et al., 2014).

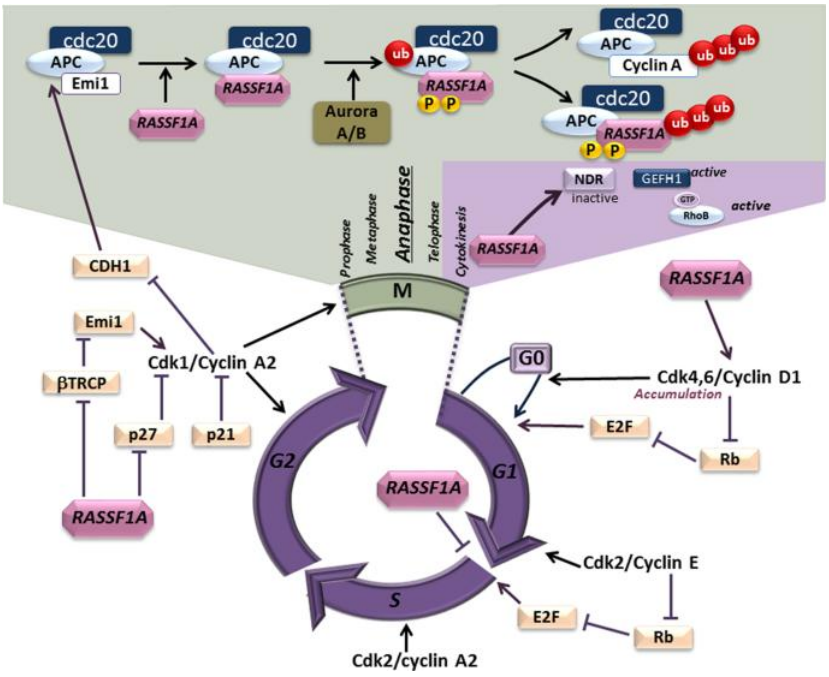



***Figure 11 : Implication de RASSF1A dans la régulation du cycle cellulaire***
*RASSF1A est impliquée à différentes étapes du cycle cellulaire assurant son contrôle et sa restriction (Dubois et al., 2019).*

### 2.2) Implication de NDR2 dans la régulation du cycle cellulaire

En lien avec les données précédentes, l'inhibition de RASSF1A dans les cellules de CBNPC induit des défauts de cytokinèse dépendants de l'activité de la kinase NDR2, contribuant à la formation de cellules polynucléées et à la progression tumorale (Keller et al., 2019). Ces observations sont cohérentes avec les fonctions connues de NDR2 dans la régulation du cycle cellulaire. En effet (*Figure 12*) :

- NDR2 contribue à la progression de la phase G1/S en réprimant p21, un inhibiteur des complexes cycline–Cdk, ce qui permet la poursuite du cycle cellulaire (Cornils et al., 2011). Dans les CBNPC, NDR2 subit une SUMOylation par SENP2 (SUMO1/Sentrin Specific Peptidase 2) entrainant l'inhibition de p21 (Cheng et al., 2024).
- Une surexpression de NDR2 a également été associée à une surduplication des centrosomes, un phénomène fréquemment observé lors de la transformation

cellulaire, susceptible de favoriser la formation de cellules polynucléées et de contribuer à la tumorigenèse (Hergovich et al., 2007).

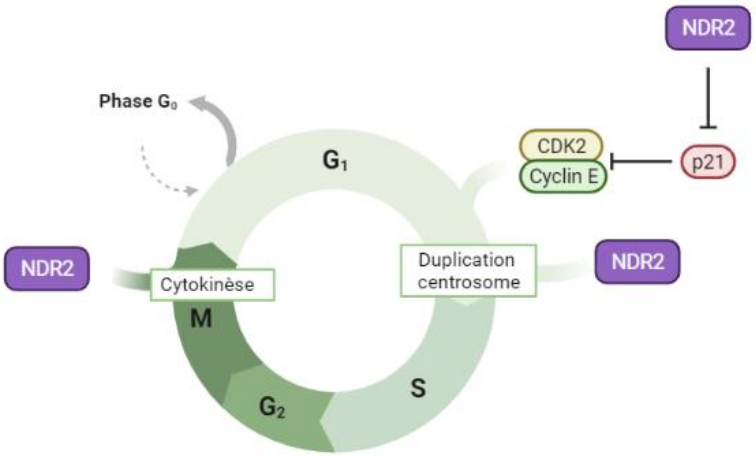



***Figure 12 : Implication de NDR2 dans la régulation du cycle cellulaire***
*NDR2 favorise la progression du cycle cellulaire par l'inhibition de p21 permettant la progression de la phase G1 à S. NDR2 est impliquée dans la duplication des centrosomes, notamment dans leur surduplication ainsi que dans la cytokinèse.*

### 3) Place des dérégulations de la voie Hippo dans la TEM et la mise en mouvement des cellules de cancers bronchiques

Comme présenté précédemment dans ce document, la voie Hippo est la gardienne du phénotype épithélial, sa dérégulation entraine l'activation inappropriée de YAP-1/TAZ. De nombreuses études ont établi un lien entre la TEM et l'activation de YAP-1 et TAZ, faisant de la voie Hippo un inducteur central de la TEM liée à la tumorigenèse.
La TEM implique une perte de polarité apicobasale et des réarrangements du cytosquelette (Y.-C. Chang et al., 2020). Ces mécanismes provoquent une dérégulation de MST1/2 et de LATS1/2 conduisant à une activation aberrante de YAP-1/TAZ (Warren et al., 2018; Zanconato et al., 2019). En revanche, l'inhibition de YAP-1/TAZ induit une morphologie épithéliale (Lamar et al., 2012).

Les interactions entre la YAP-1/TAZ et la TEM sont bidirectionnelles :

- La TEM induit une relocalisation cytoplasmique du complexe de polarité SCRIB, favorisant la translocation nucléaire de YAP-1/TAZ (Martin-Belmonte & Perez-Moreno, 2012).
- La perte d'expression du suppresseur de tumeur LKB1 conduit à une déstabilisation du complexe SCRIB et par conséquent à l'activation de YAP-1/TAZ (Mohseni et al., 2014).
- YAP-1 réprime l'expression de l'E-cadhérine et de l'occludine et favorise Snail1/2, Slug, ZEB1 (Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1) et TWIST (Warren et al., 2018), et l'expression de gènes impliqués dans la TEM (Bennett & Harvey, 2006).
- YAP-1 influence également la motilité cellulaire à travers des voies mécanosensibles : adhésion focale**,** protrusions d'actine et migration (He et al., 2016).
- YAP-1 agit aussi comme un mécanosenseur activé par la friction dans les vaisseaux lymphatiques en aval de ROCK-LIMK-cofiline, favorisant la migration métastatique (H. J. Lee et al., 2017), ou *via* le PDGF (Platelet-derived growth factor), qui active YAP-1 par la cascade RhoA/PP1 (T. Li et al., 2021).
- Les petites GTPases comme Rap1 (Ras-related protein) répriment la voie Hippo, entraînant des effets sur la F-actine et la migration (Y.-C. Chang et al., 2018). À l'inverse, Rap2, un homologue de Rap1, active LATS1/2 en réponse à la faible rigidité de la MEC (Z. Meng et al., 2018). Ces interactions soulignent le rôle central de YAP-1/TAZ dans l'intégration des signaux mécaniques et oncogéniques dans les métastases.

YAP-1 est également impliqué dans le mimétisme vasculaire, où les cellules tumorales acquièrent un phénotype pseudo-endothélial, facilitant leur accès au système vasculaire. Dans les CBNPC, YAP-1 est nécessaire à la formation de structures tubulaires exprimant des marqueurs des néovaisseaux, comme CD31, dans le Matrigel, son inhibition réduit significativement cette capacité morphogénique (Zanconato et al., 2018 ; Warren et al., 2018).

### 4) Place des dérégulations de la voie Hippo dans la survie des cellules de cancers bronchiques

Dans le contexte tumoral, la résistance à l'anoïkis est cruciale pour la survie des cellules tumorales détachées de la MEC ou circulantes. La voie Hippo, *via* YAP-1/TAZ, module directement cette résistance.

Overholtzer et al., ont démontré que la surexpression de YAP-1 confère aux cellules malignes une résistance à l'anoïkis ainsi qu'à d'autres formes d'apoptose induites par divers stress cellulaire, incluant les chimiothérapies ou l'irradiation (Overholtzer et al., 2006). Mécaniquement, YAP-1/TAZ répriment l'expression de protéines pro-apoptotiques (BIM (Bcl-2-like protein 11)), augmentent l'expression d'inhibiteurs de l'apoptose (IAPs), et activent des voies pro-survie telles que la voie ERK (X. Zhang, Abdelrahman, et al., 2018)

Toutefois, le détachement cellulaire active LATS1/2 par des modifications du cytosquelette, inhibant YAP-1/TAZ (B. Zhao et al., 2012). Cette inhibition est levée lors de la réadhésion cellulaire, favorisant la survie. Ainsi, la signalisation Hippo module directement la survie cellulaire en réponse aux modifications mécaniques de l'environnement, et son inhibition favorise une survie indépendante de l'ancrage, caractéristique des cellules métastatiques.

### 5) Place des dérégulations de la voie Hippo dans l'établissement des CSC de cancers bronchiques

La voie Hippo est nécessaire à la régulation du destin cellulaire et à la différenciation des cellules progénitrices, une fonction également observée dans le contrôle des CSC dans divers types de tumeurs (Cordenonsi et al., 2011; Hiemer & Varelas, 2013). Camargo et al. ont notamment montré que YAP-1 maintient les cellules progénitrices intestinales dans un état indifférencié en inhibant leur différenciation (Camargo et al., 2007). Cette fonction a depuis été confirmée dans plusieurs tissus et organes, tels que le foie, le cerveau, la peau, le cœur et l'hypophyse (J. Mo et al., 2014; Lodge et al., 2019; LeBlanc et al., 2021). Ainsi, la voie Hippo agit comme un régulateur négatif de YAP-1/TAZ, jouant un rôle de gardien de la différenciation cellulaire. Bien que peu décrit dans les CBNPC, YAP-1 et TAZ impactent le maintien des CSC dans d'autres cancers. Dans le cancer du sein, TAZ s'impose comme un acteur clé du maintien du phénotype CSC : sa surexpression induit des propriétés d'auto-renouvellement et une forte

capacité tumorigénique, tandis que son inhibition abolit ces fonctions (Cordenonsi et al., 2011; J. Mo et al., 2014). YAP-1 et TAZ opèrent en aval de CD44, SOX2, miR-130b et PDE5/PKG (Tanaka et al., 2017; Ervin et al., 2022), amenant à l'expression de gènes de pluripotence, notamment *NANOG, OCT4, SOX2, SOX9* et *IL-6* (S. Song et al., 2014; Ervin et al., 2022). Par cette régulation transcriptionnelle, ils soutiennent les programmes génétiques associés aux CSC et renforcent le potentiel métastatique des cellules tumorales.

### 6) Place des dérégulations de la voie Hippo dans le remodelage du microenvironnement

YAP-1 et TAZ sont également activés dans les cellules du microenvironnement tumoral, telles que les CAF, les cellules endothéliales et les péricytes, où ils jouent un rôle clé dans la promotion de l'angiogenèse (Zanconato et al., 2019; Yan et al., 2022). Leur activation est régulée par divers signaux comme l'hypoxie, la rigidité de la MEC ou encore les cytokines pro-angiogéniques, et elle favorise la formation de réseaux vasculaires tumoraux anormaux et perméables, ce qui renforce l'agressivité du cancer (Piccolo et al., 2023; Yan et al., 2022). Des gènes cibles de YAP-1/TAZ, tels que *CTGF (*Connective Tissue Growth Factor) et *Cyr61 (*Cysteine-rich angiogenic inducer 61), sont directement impliqués dans le remodelage de la MEC et l'angiogenèse, facilitant ainsi le développement tumoral (Kuo et al., 2021; Leask et al., 2024) (*Figure 13*).

Par ailleurs, YAP-1/TAZ influencent fortement les interactions avec le système immunitaire. Leur activation favorise le recrutement de macrophages pro-tumorigènes et de MDSC, participant à l'instauration d'un microenvironnement immunosuppresseur (S. M. White et al., 2019; Zanconato et al., 2019; Piccolo et al., 2023). Ils sont également requis pour l'expansion des lymphocytes Tregs au sein des tumeurs, tandis que leur inhibition dans les lymphocytes T effecteurs favorise leur activation, leur infiltration et donc la réponse immunitaire antitumorale (Ni et al., 2018; Stampouloglou et al., 2020) (*Figure 13)*.

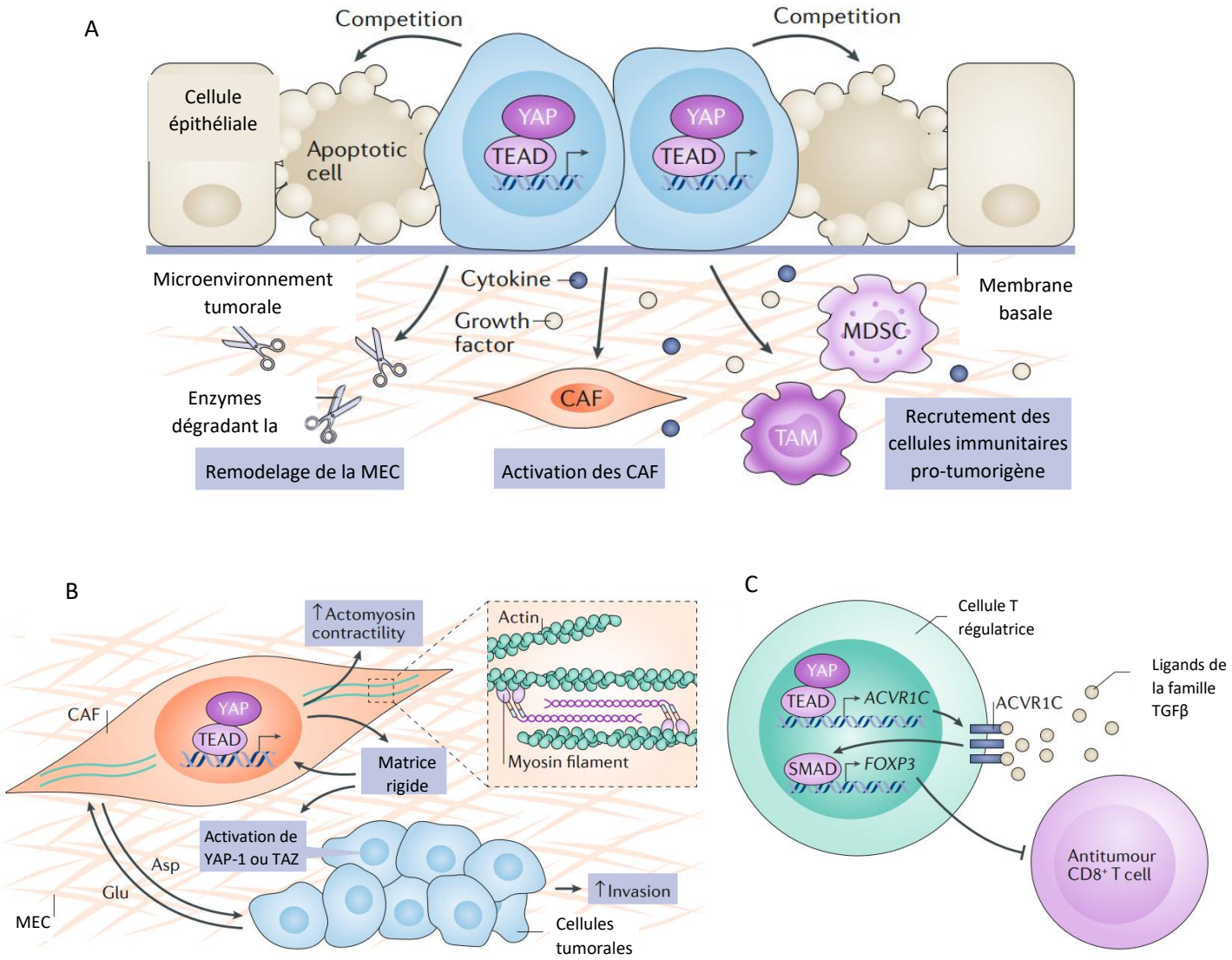



***Figure 13 : Impact de l'activation de YAP-1/TAZ sur le stroma tumoral***

***(A)*** *L'activation de YAP-1 et TAZ dans les cellules cancéreuses modifie la composition et les propriétés mécaniques de la matrice extracellulaire (MEC) tumorale. Cette modulation s'effectue par la sécrétion de composants matriciels, d'enzymes de remodelage (telles que les métalloprotéinases), ainsi que par le recrutement de cellules stromales pro-tumorigènes, notamment les fibroblastes associés au cancer (CAF) et diverses cellules immunosuppressives. Ces dernières incluent les macrophages associés aux tumeurs (TAM) et les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), recrutées via des cytokines tumorales.*

***(B), (C)*** *YAP-1 et TAZ sont activés non seulement dans les cellules tumorales, mais aussi dans les cellules stromales non cancéreuses du microenvironnement tumoral, telles que les fibroblastes associés au cancer (CAF) et les lymphocytes T régulateurs (Treg).* ***(B)*** *Les cellules cancéreuses et les CAF participent activement au remodelage de la MEC, générant une matrice rigide qui favorise l'activation de YAP-1 et TAZ dans les deux types cellulaires. Cette activation mécanosensible régule également la communication métabolique entre cellules cancéreuses et CAF, notamment par l'échange d'acides aminés essentiels. Pour simplifier, seul YAP-1 est représenté dans ce panneau, bien que TAZ joue un rôle similaire.*

***(C)*** *Dans les cellules Treg, YAP-1 amplifie la signalisation du facteur de croissance transformant β (TGF-β) en régulant positivement l'expression du récepteur ACVR1C de l'activine. Cette modulation conduit à une augmentation du facteur de transcription FOXP3, spécifique des Treg, et à une inhibition dépendante de FOXP3 des lymphocytes T cytotoxiques antitumoraux. Pour des raisons de clarté, seul YAP est représenté dans le panneau B ; cependant, TAZ exerce des fonctions similaires (adapté de Zanconato et al, 2019).*

# Objectifs de la thèse

Malgré les avancées thérapeutiques de ces dernières années, le cancer du poumon demeure l'une des principales causes de mortalité liée au cancer en France, avec un taux de survie à cinq ans encore très faible. Parmi les formes les plus fréquentes, les CBNPC présentent une forte propension à la formation de métastases, notamment cérébrales, aggravant ainsi considérablement le pronostic des patients.

Parmi les mécanismes impliqués dans l'agressivité des CBNPC, l'altération de la voie de signalisation Hippo occupe une place importante. Cette altération conduit à une activation aberrante de ses effecteurs terminaux, YAP-1 et TAZ, connus pour leur rôle dans la progression tumorale. Bien que cette voie soit majoritairement décrite comme suppresseur de tumeur, notre équipe a mis en évidence un rôle oncogénique de la kinase NDR2 dans la carcinogenèse bronchique (Keller et al., 2019). En effet, l'activation de NDR2 entraîne, de manière indirecte, l'activation de YAP-1, contribuant ainsi au développement tumoral.

NDR2 semble également impliquée dans le processus de dissémination métastatique des cellules de CBNPC. Toutefois, son rôle exact dans ces mécanismes reste encore peu étudié et mal caractérisé à ce jour. C'est dans cette optique que nous avons entrepris de mieux comprendre les fonctions de la kinase NDR2 dans les processus favorisant la progression tumorale et la formation de métastases dans les CBNPC.

Afin de mieux appréhender ses effets, il nous a semblé essentiel :

- D'analyser l'impact du microenvironnement hypoxique, caractéristique majeure des CBNPC, sur la régulation de la voie Hippo et en particulier sur NDR2. Cette étude avait été amorcée avant mon intégration au sein de l'équipe.
- D'explorer l'interactome de NDR2 afin d'identifier ses partenaires moléculaires susceptibles de rendre compte de ses fonctions pro-métastatiques, et ainsi de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques, potentiellement plus accessibles que NDR2 elle-même. L'analyse de cet interactome a ouvert une nouvelle piste de recherche : de déterminer l'implication de NDR2 dans la régulation de l'autophagie au sein des cellules de CBNPC.

# Résultats Partie I

L'activation de NDR2 induite par l'hypoxie tumorale contribue à la formation des métastases cérébrales du cancer bronchique non à petites cellules

# I – Hypoxie

## A. Hypoxie et HIF

### 1) Généralités

L'hypoxie correspond à une diminution du taux d'oxygène par rapport aux besoins physiologiques. L'hypoxie tumorale est caractérisée par une pression partielle en oxygène (pO2) inférieur à 10 mmHg (Z. Chen et al., 2023).

L'hypoxie est une caractéristique majeure des tumeurs solides (Y. Ye et al., 2019). Cette condition, résultant d'un déséquilibre entre les besoins en oxygène des cellules tumorales en prolifération rapide et une vascularisation inadéquate, est connue depuis plusieurs décennies comme un facteur de résistance aux traitements anticancéreux. Dès 1953, Gray et al. ont démontré que les cellules cancéreuses exposées à un environnement bien oxygéné sont trois fois plus sensibles à l'irradiation que les cellules hypoxiques (Gray et al., 1953). Deux ans plus tard, Thomlinson et Gray observaient, dans des biopsies de carcinomes pulmonaires, la présence de zones centrales pauvres en oxygène, posant les bases de l'hypoxie tumorale comme concept central en cancérologie (Thomlinson & Gray, 1955).

Depuis, de nombreuses études ont démontré que l'hypoxie intra-tumorale est un moteur majeur de progression tumorale, de résistance thérapeutique et de reprogrammation phénotypique des cellules cancéreuses. Ces effets sont principalement médiés par une famille de facteurs de transcription induits par l'hypoxie, les HIF, dont HIF-1α et HIF-2α sont les isoformes les plus étudiées.

Le rôle fondamental des HIF dans la régulation de la réponse cellulaire à l'hypoxie a été reconnu par l'attribution du prix Nobel de physiologie ou médecine en 2019 à William Kaelin, Peter Ratcliffe et Gregg Semenza, les pionniers dans le domaine.

### 2) Régulation moléculaire des HIF

Les HIF sont des protéines hétérodimériques composées d'une sous-unité régulée par l'oxygène (HIF-1α, HIF-2α ou HIF-3α) et d'une sous-unité constitutive (HIF-1β/ARNT). Ces protéines appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS (basic Helix-Loop-

Helix Per-Arnt-Sim) et se lient aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) contenant une séquence consensus 5'-RCGTG-3' dans les promoteurs des gènes cibles (Semenza et al., 1996). Les sous-unités α possèdent deux domaines de transactivation (NAD et CAD) et leur stabilité est régulée de manière post-traductionnelle par l'oxygène. En normoxie, les enzymes prolyl hydroxylases (PHD) hydroxylent des résidus prolines de HIF-α, facilitant son interaction avec la protéine pVHL, qui cible HIF-α pour une dégradation *via* le protéasome (Schofield & Ratcliffe, 2004). En hypoxie, les PHD sont inactive, permettant à HIF-α d'échapper à la dégradation, de se dimériser avec HIF-1β, de transloquer dans le noyau et d'activer la transcription de centaines de gènes (Kaelin & Ratcliffe, 2008) (*Figure 14*).

La régulation fine de l'activité transcriptionnelle est également assurée par FIH1 (Factor Inhibiting HIF-1), qui hydroxyle un résidu asparagine du domaine CAD, bloquant le recrutement des coactivateurs CBP/p300 (Kaelin, 2005). FIH1 est actif à des niveaux d'oxygène plus faibles que les PHD, lui permettant de réguler les réponses à l'hypoxie modérée (Dayan et al., 2006). De plus, HIF-2α est moins sensible à cette inhibition que HIF-1α (Bracken et al., 2006).

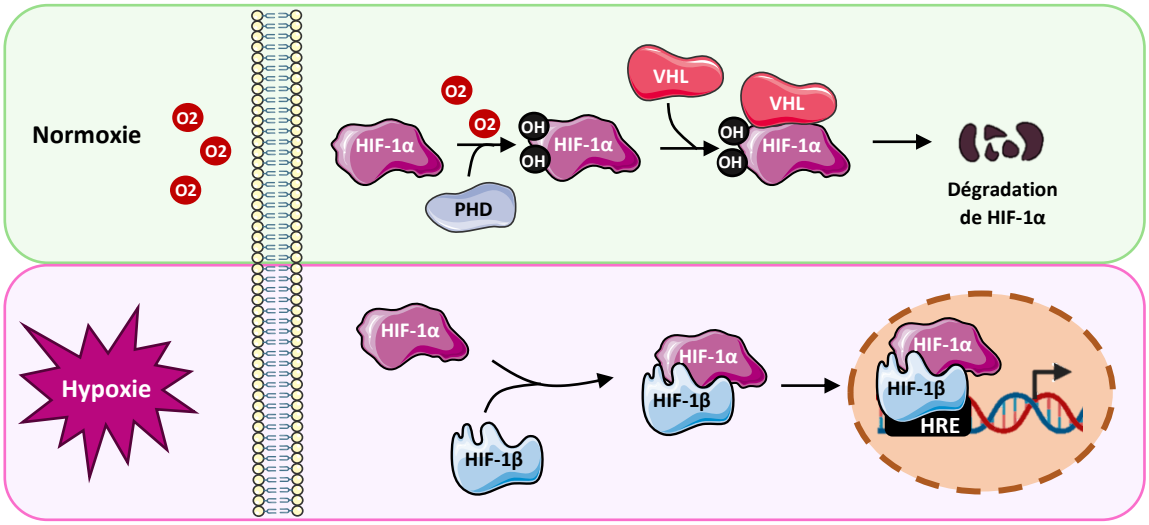



***Figure 14 : Régulation de HIF-1α selon l'état d'oxygénation cellulaire***

*En conditions normoxiques, le facteur inductible par l'hypoxie HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha) subit une hydroxylation post-traductionnelle sur des résidus prolines par les prolyl-hydroxylases (PHD). Cette modification permet la reconnaissance de HIF-1α par le complexe de Von Hippel–Lindau (VHL), une E3 ubiquitine ligase, qui entraîne son ubiquitination puis sa dégradation rapide par le protéasome, empêchant ainsi toute activité transcriptionnelle.*

*En conditions hypoxiques, l'activité des PHD est inhibée en raison du manque d'oxygène, ce qui empêche l'hydroxylation de HIF-1α. HIF-1α échappe alors à la dégradation, s'accumule dans le cytoplasme, puis forme un hétérodimère avec HIF-1β pour constituer le complexe transcriptionnel HIF-1. Ce complexe transloque ensuite vers le noyau, où il se lie aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE, Hypoxia Response Elements) présents dans les promoteurs de nombreux gènes cibles impliqués dans l'adaptation cellulaire à l'hypoxie, notamment l'angiogenèse, le métabolisme, la survie cellulaire et la progression tumorale (d'après Kaelin & Ratcliffe, 2008).*

## B. Hypoxie et CBNPC

### 1) Hypoxie tumorale et activation des HIF

L'hypoxie tumorale résulte de plusieurs anomalies structurelles : une vascularisation aberrante, un débit sanguin irrégulier, une perte de régulation vasomotrice ainsi que mauvaise vascularisation au centre de la tumeur. Cette situation stabilise les HIF favorisant l'adaptation métabolique, la prolifération, la survie, et l'angiogenèse.

Dans les tumeurs solides, la croissance rapide des cellules cancéreuses entraîne souvent une vascularisation inadéquate, conduisant à une hypoxie au sein du microenvironnement tumoral. Cette hypoxie chronique apparaît lorsque la distance entre les cellules tumorales et les capillaires dépasse 100–200 µm, limitant la diffusion de l'oxygène (Dachs et al., 1997; Dewhirst et al., 1999; Horsman & Vaupel, 2016). L'hypoxie est également exacerbée par la formation de vaisseaux anormaux et dysfonctionnels (Vaupel et al., 1989), ainsi que par des altérations stromales telles que la prolifération des CAF et le dépôt de MEC, entraînant une compression vasculaire et une perfusion réduite (Gilkes et al., 2014). Cela favorise la thrombose, aggravant l'hypoxie tissulaire (Vaupel, 1977).

Trois populations cellulaires hypoxiques coexistent dans une tumeur (Z. Chen et al., 2023) :

1. **Les cellules hypoxiques chroniques non *via*bles**, qui finissent par mourir *in situ* et contribuent à la nécrose tumorale centrale.
2. **Les cellules hypoxiques chroniques *via*bles**, qui s'adaptent à l'hypoxie par des modifications transcriptomiques et métaboliques, favorisant leur prolifération, leur résistance thérapeutique et leur radiorésistance
3. **Les cellules hypoxiques transitoires**, situées plus près des vaisseaux fonctionnels, exposées à une hypoxie intermittente mais suffisante pour induire des réponses adaptatives.

Globalement, l'hypoxie dans le microenvironnement tumoral déclenche des altérations moléculaires majeures des cellules cancéreuses, renforçant leur comportement malin, notamment la prolifération, la migration, l'invasion, la TEM, ainsi qu'une résistance accrue aux traitements. Dans de nombreux types de cancers, une surexpression de HIF-1α est corrélée à une agressivité accrue, un pronostic défavorable, et une résistance thérapeutique (Vaupel, 2004; Semenza, 2010; Shi et al., 2025). Toutefois, la contribution de HIF-1α à la croissance

tumorale varie selon le contexte tumoral : dans certains modèles murins, sa délétion ralentit la progression tumorale, tandis que dans d'autres, elle peut paradoxalement augmenter la prolifération (Carmeliet et al., 1998; Blouw et al., 2003).

La présence d'une hypoxie tumorale primaire est associée à un risque accru de récidive locale et métastatique. L'exposition des cellules cancéreuses à une hypoxie favorise les métastases spontanées, comme observé dans des modèles de fibrosarcome et de cancer du col de l'utérus (S. D. Young et al., 1988; Jaeger et al., 2001; Cairns & Hill, 2004). Sous pression sélective, l'hypoxie élimine les cellules sensibles, laissant une population adaptée et plus agressive (Fang et al., 2008; Verduzco et al., 2015).

### 2) Hypoxie et instabilité génétique

L'hypoxie tumorale constitue un facteur clé de la carcinogenèse, en induisant des dommages à l'ADN et en sélectionnant des phénotypes cellulaires agressifs. Elle augmente significativement la fréquence des mutations dans les cellules cancéreuses (C. Y. Li et al., 2001; Papp-Szabó et al., 2005). Par ailleurs, des conditions hypoxiques (<5 % d'$O_2$) favorisent la reprogrammation cellulaire et le maintien de l'auto-renouvellement, mécanismes également observés chez les CSC présentes dans des niches hypoxiques (Z. Li et al., 2009; Mathieu et al., 2013; Tuy et al., 2021). Ces CSC, caractérisées par un fort potentiel tumorigène et métastatique, sont amplifiées par l'hypoxie et le stress oxydatif, qui activent l'expression d'oncogènes et contribuent à l'émergence de clones plus agressifs (Semenza, 2017; Hernansanz-Agustín et al., 2020; Tuy et al., 2021).

Outre l'hypoxie, plusieurs altérations oncogéniques activent HIF indépendamment de la pression partielle en oxygène :

- L'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, souvent par mutation de *PTEN* ou surexpression de EGFR, stimule la traduction de HIF-1α (Wan & Wu, 2016; J. Wei et al., 2018; Tian et al., 2023).
- L'activation des voie JAK/STAT3, NF-kb, MAPK, Wnt, Notch (van Uden et al., 2011; LaGory & Giaccia, 2016; Y. Li et al., 2020).
- Les mutations perte de fonction de *TP53*, renforçant la résistance à l'apoptose et la capacité métastatique par la stabilisation de HIF-1 α (Ravi et al., 2000).

- Les mutations activatrices de *Ras*, *via* inhibition de l'hydroxylation et augmentation des ROS mitochondriaux (Gerald et al., 2004).
- L'inactivation du gène *VHL* entraîne la stabilisation constitutive de HIF-α (Kaelin, 2007). En cas de perte de fonction de VHL, HIF-1α devient stable même en présence d'O2. Sa perte induit également un changement métabolique passant d'un métabolisme oxydatif à la glycolyse et une diminution de la respiration mitochondriale (H. Zhang et al., 2007).

L'hypoxie tumorale contribue à l'instabilité génomique, facilitant l'émergence de mutations somatiques caractéristiques, notamment dans *TP53*, *PTEN* et *MYC* (Bhandari et al., 2020). Certains polymorphismes de *HIF-1α* et *VEGFA* sont associés à un pronostic défavorable (Heist et al., 2008; Jain et al., 2009; Y. Li, Li, et al., 2015).

Dans le CBNPC, l'hypoxie influence également la fréquence et l'expression de gènes oncogéniques clés comme *EGFR* et *ALK*. EGFR peut activer la voie HIF-1α et contribue à l'angiogenèse et à la progression tumorale. Il a été démontré que l'hypoxie peut induire une résistance aux inhibiteurs de l'EGFR, notamment *via* la coopération entre HIF-1α et c-Jun (Swinson & O'Byrne, 2006; T. Wang et al., 2007; S. Meng et al., 2018a; Qi et al., 2019).

### 3) Angiogenèse

Introduit par Folkman dans les années 1970, le concept d'angiogenèse tumorale repose sur l'idée que les cellules cancéreuses doivent générer leur propre réseau vasculaire pour croître et survivre (Folkman, 1971). L'hypoxie stimule la néo-angiogenèse en induisant la stabilisation de HIF-1α, qui active la transcription de gènes pro-angiogéniques tels que *VEGFA* et *EPO (*Erythropoietin), particulièrement en l'absence de p53, dont la suppression potentialise ces effets (Ravi et al., 2000; Zhong et al., 2000). Des facteurs tels que ELF3 (E74 Like ETS Transcription Factor 3), induit par l'hypoxie, favorisent également la sécrétion d'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) et de VEGFA, tandis que HIF-1α interagit avec les récepteurs β-adrénergiques pour renforcer la réponse angiogénique (Carmeliet & Jain, 2011; Amato et al., 2022; Seo et al., 2022). En parallèle, l'hypoxie stimule la production d'acide hyaluronique et l'activité hyaluronidase, contribuant à la modification de la MEC et facilitant l'angiogenèse (F. Gao et al., 2005).

Cependant, cette vascularisation tumorale est souvent anarchique : les vaisseaux néoformés sont immatures, perméables et fonctionnellement inefficaces (Rey & Semenza, 2010; Korbecki et al., 2021). Cette désorganisation conduit à une hypoperfusion, à une pression interstitielle accrue. Ce phénomène alimente le cercle vicieux de l'hypoxie chronique, facilitant alors la sélection clonale et la dissémination métastatique (Semenza, 2003).

HIF-1α stimule également l'angiogenèse par l'induction de VEGFA et de l'angiopoïétine-2, assurant l'apport en oxygène et nutriments nécessaires à la prolifération et à la dissémination tumorale (Masoud & Li, 2015).

### 4) Reprogrammation métabolique induite par HIF-1α

HIF-1α joue un rôle central dans l'adaptation métabolique des cellules tumorales à l'hypoxie. Il favorise le passage de la phosphorylation oxydative vers une glycolyse accrue, même en présence d'oxygène (effet Warburg). Ce phénomène repose en grande partie sur l'effet Warburg, selon lequel les cellules tumorales privilégient la glycolyse anaérobie, convertissant le glucose en lactate, même en présence d'un apport suffisant en oxygène et d'une fonction mitochondriale intacte (Dai et al., 2023). Cette stratégie métabolique, bien que moins efficiente en ATP, favorise la production rapide d'énergie et fournit des intermédiaires nécessaires à la biosynthèse cellulaire, facilitant la prolifération tumorale (Courtnay et al., 2015) (*Figure 15*).

Ceci permet de limiter la production de ROS mitochondriaux et de maintenir l'homéostasie rédox (J. Kim et al., 2006).

HIF-1α régule :

- PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase 1), qui inhibe la pyruvate déshydrogénase, bloquant ainsi l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs.
- LDHA (Lactate déshydrogénase A), qui convertit le pyruvate en lactate.
- Transporteur de glucose GLUT-1, augmentant l'absorption du glucose et la production de lactate (C. Chen et al., 2001; F. Luo et al., 2006; B.-F. Ren et al., 2008), joue un rôle central dans le remodelage du microenvironnement tumoral.
- COX4-2, isoforme favorisant l'efficacité respiratoire mitochondriale en condition hypoxique (Fukuda et al., 2007; Timón-Gómez & Barrientos, 2020).

- miR-210, qui cible ISCU (Iron-Sulfur Cluster Assembly Enzyme), limitant l'activité de la chaîne respiratoire (S. Y. Chan et al., 2009).

Malgré une réduction globale du métabolisme mitochondrial, l'hypoxie tumorale est paradoxalement associée à une augmentation de la production de ROS, notamment au niveau du complexe III de la chaine respiratoire (Chandel et al., 2000; Guzy et al., 2005).

De plus, HIF-1α réprime c-MYC (Löfstedt et al., 2009; Z. Chen et al., 2023) inhibant la biogenèse mitochondriale et favorisant l'adaptation à l'hypoxie (H. Zhang et al., 2007). Néanmoins, MYC est surexprimé dans ~70 % des cancers humains (J. A. Nilsson & Cleveland, 2003) et interagit aussi avec HIF-2α, renforçant la prolifération, le métabolisme et l'auto-renouvellement (Das et al., 2019; Hoefflin et al., 2020). Ensemble, HIF-1α et MYC favorisent une glycolyse accrue, stimulant la croissance tumorale (Gordan et al., 2007).

Sous hypoxie, les cellules tumorales exploitent la glutamine pour produire de l'α-cétoglutarate, alimentant un cycle de Krebs tronqué, essentiel à la biosynthèse d'acétyl-CoA et à la synthèse de lipides. De plus, HIF-1α induit l'expression des enzymes de la glycogénogenèse, assurant le stockage de glucose sous forme de glycogène, garantissant une source d'énergie rapide et régulant les équilibres rédox dans un environnement défavorable (Semenza, 2013).

HIF-1α régule également le pH intracellulaire et extracellulaire en contrôlant l'expression de MCT4 (Monocarboxylate Transporter 4, Carbonic Anhydrase IX (CA-IX) et NHE1 (Sodium-hydrogen exchanger 1), favorisant l'acidification du microenvironnement tumoral, un facteur connu pour promouvoir l'invasion et la résistance (Semenza, 2013; Parks et al., 2016; Takacova et al., 2021). En plus d'abaisser le pH local, créant un environnement favorable à la prolifération des cellules tumorales (Shang et al., 2022), le lactate active la voie de signalisation ERK/STAT3, favorise la polarisation des macrophages associés aux tumeurs vers un phénotype M2 pro-tumoral, et stimule l'angiogenèse, contribuant ainsi à la croissance tumorale et aux métastases (Z. Guo et al., 2023; Nisar et al., 2023). Par ailleurs, le lactate exerce des effets immunosuppresseurs en modulant l'activité des cellules immunitaires, limitant ainsi l'efficacité des réponses antitumorales (C. Zhang et al., 2024).

Outre la glycolyse, d'autres voies comme l'oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative mitochondriale restent actives. Les mitochondries contribuent à la production

d'ATP, au contrôle redox, à la génération de ROS et régulent directement la prolifération et la migration cellulaires (Porporato et al., 2018).

En somme, l'adaptation métabolique du CBNPC à l'hypoxie repose sur l'intégration dynamique de plusieurs voies métaboliques, glycolyse, production de lactate, et métabolisme mitochondrial, qui coopèrent pour favoriser la progression tumorale et les métastases.

### 5) Hypoxie, TEM, migration et invasion

L'hypoxie est importante dans la progression tumorale, en particulier dans les processus de TEM et d'invasion (Barrak et al., 2020) (*Figure 15*). En effet, l'hypoxie :

- Favorise la TEM, par la régulation directement l'expression de plusieurs facteurs de transcription pro-TEM tels que Snail, TWIST ou ZEB, médié par HIF-1α et active indirectement les voies Notch et Wnt ainsi que des régulateurs épigénétiques HDAC3 et WDR5 (WD Repeat Domain 5) (M.-Z. Wu et al., 2011; M.-H. Yang et al., 2008; W. Zhang et al., 2015). La surexpression et activation de TWIST par l'hypoxie induit une diminution des marqueur épithéliaux tel que l'E-cadhérine (Cho et al., 2016) et favorise la résistance à l'anoïkis (Kumar et al., 2011).
- L'hypoxie diminue l'expression des connexines (CX26, CX43), perturbant la communication intercellulaire, ce qui accroît la motilité cellulaire des cellules de CBNPC (S.-G. Zeng et al., 2019), phénomène renforcé par de la TEM induite par HIF-1α (Hapke & Haake, 2020).
- Permet l'invasion, par des modifications de la MEC, en stimulant la production de MMP et d'enzymes de modification du collagène, rendant la MEC plus permissive à l'invasion tumorale (Hofbauer et al., 2003; J. Y. Choi et al., 2011; Della Rocca et al., 2022). HIF-1 et HIF-2 activent la transcription de ADAM12 (A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 12), une MMP qui libère HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) de la matrice. HB-EGF active l'EGFR, conduisant à la phosphorylation de FAK. L'inactivation de ADAM12 inhibe complètement la motilité aléatoire, la migration dirigée, l'invasion *in vitro*, ainsi que les métastases pulmonaires du cancer du sein *in vivo* (R. Wang et al., 2021).

### 6) Hypoxie, microenvironnement tumoral et tolérance immunitaire

L'hypoxie tumorale constitue un facteur clé dans la modulation du microenvironnement tumoral, favorisant à la fois l'échappement immunitaire et la progression néoplasique (*Figure 15*). Elle induit notamment l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales, contribuant à l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale (Ding et al., 2021). En parallèle, l'hypoxie exerce des effets profonds sur les cellules stromales, y compris les cellules immunitaires, renforçant ainsi la progression tumorale et la résistance aux traitements (Chouaib et al., 2017).

Les facteurs induits par l'hypoxie, HIF-1α et HIF-2α, orchestrent l'expression de nombreux gènes impliqués dans les réponses stromales. HIF-1α joue un rôle central dans la régulation des fonctions immunitaires innées et adaptatives, notamment au sein des macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques et lymphocytes T (Z. Chen et al., 2023). De son côté, HIF-2α intervient dans l'homéostasie du monoxyde d'azote au sein des macrophages. De plus, l'inactivation du gène *HIF-1β* dans les lymphocytes T $CD8^+$ compromet la production de molécules cytotoxiques telles que les perforines et les granzymes, altérant ainsi leur potentiel effecteur (Finlay et al., 2012).

Dans les CBNPC, l'hypoxie impacte également les cellules non tumorales du stroma. Les cellules souches mésenchymateuses, soumises à un environnement hypoxique, favorisent la TEM et induisent une polarisation pro-tumorale des macrophages (W. Ren et al., 2019). Ces modifications du stroma entretiennent à la fois l'agressivité tumorale, le maintien des propriétés de cellules souches cancéreuses et la dynamique de la TEM (Noman et al., 2014).

Par ailleurs, l'hypoxie active la voie NF-κB, en synergie avec les facteurs HIF, contribuant ainsi à l'inflammation tumorale (D'Ignazio et al., 2017). Les TAM, qui représentent la population immunitaire dominante dans le microenvironnement tumoral, influencent la progression cancéreuse en fonction de leur polarisation. Ils participent activement à l'entretien de l'hypoxie et à l'augmentation de la glycolyse tumorale (Henze & Mazzone, 2016).

L'expression de PD-L1 induite par l'hypoxie joue un rôle majeur dans l'échappement immunitaire (Giatromanolaki et al., 2019; Koh et al., 2019). Dans ce contexte, les thérapies ciblant l'axe PD-1/PD-L1 ont démontré une efficacité notable dans le traitement du CBNPC (Corrales et al., 2018). Une corrélation étroite a par ailleurs été établie entre les niveaux

d'expression de PD-L1, HIF-1α, VEGFA et CA-IX dans les tumeurs hypoxiques (Koh et al., 2019), soulignant l'interconnexion entre hypoxie, angiogenèse et immunosuppression.

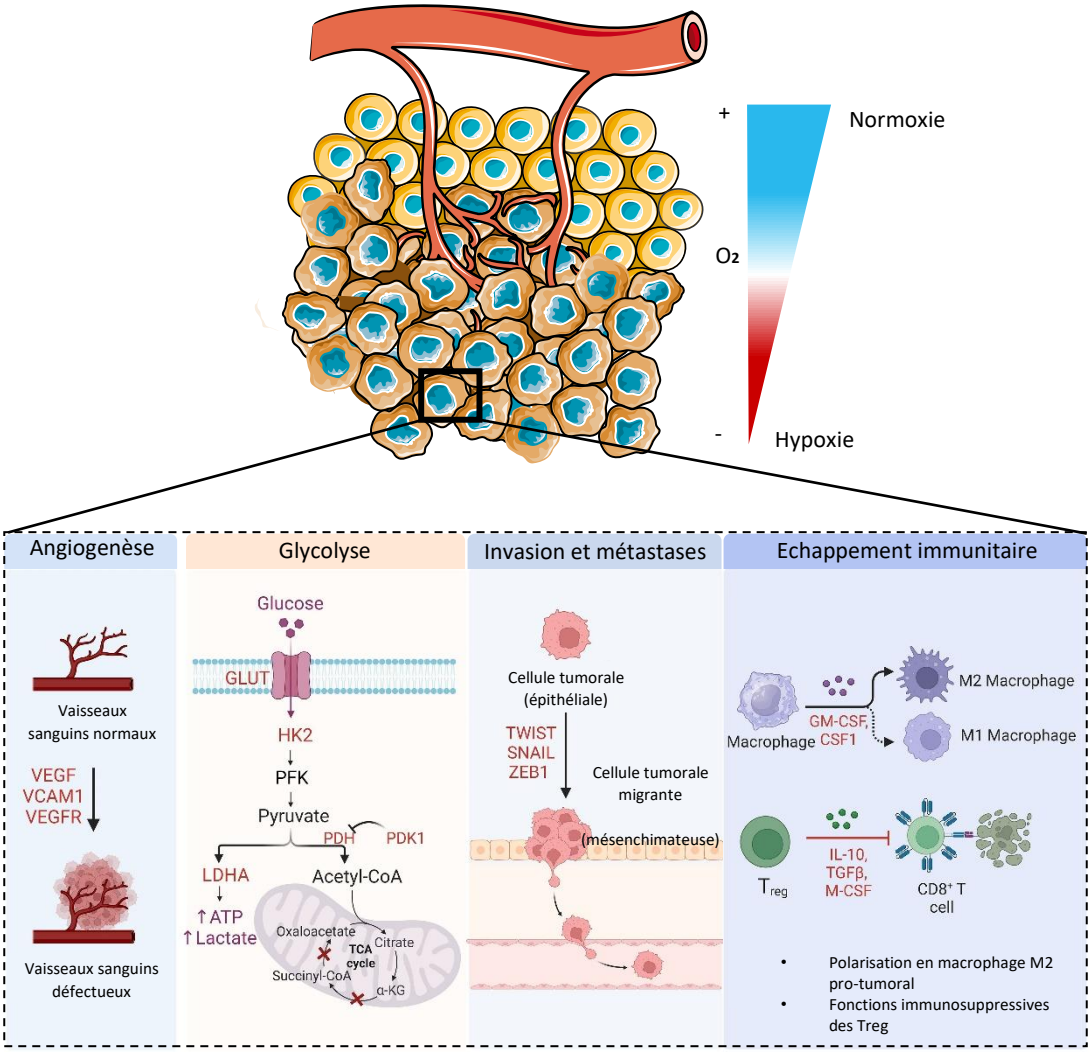



***Figure 15 : Effets de l'hypoxie sur le microenvironnement tumoral***

*L'hypoxie, caractéristique majeure du microenvironnement tumoral, joue un rôle central dans la progression du cancer en modulant divers aspects biologiques de la tumeur et de son environnement.*

*<u>Angiogenèse tumorale</u> : En réponse à l'hypoxie, les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1). Ces molécules stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales, favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins anormaux, nécessaires à l'apport en nutriments et à l'élimination des déchets tumoraux.*

*<u>Reprogrammation métabolique</u> : L'hypoxie induit une reprogrammation du métabolisme cellulaire, en favorisant notamment la glycolyse anaérobie (effet Warburg), permettant aux cellules tumorales de produire de l'énergie même en l'absence d'oxygène, tout en contribuant à l'acidification du microenvironnement.*

*Favorisation de l'invasion et des métastases :*

*En modulant l'expression de gènes liés à la motilité cellulaire et au remodelage de la matrice extracellulaire, l'hypoxie facilite la migration et l'invasion des cellules tumorales, participant ainsi à la dissémination métastatique.*

*<u>Échappement immunitaire</u> : L'hypoxie contribue à l'immunosuppression en agissant sur les composantes du système immunitaire. Elle favorise la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 (pro-tumoral) et soutient les fonctions immunosuppressives des lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces modifications altèrent la surveillance immunitaire et permettent à la tumeur d'échapper à la destruction par le système immunitaire (adapté de Zhi et al, 2024).*

### 7) Hypoxie et exosomes

Les exosomes tumoraux, vésicules extracellulaires sécrétées par les cellules cancéreuses et stromales, jouent un rôle central dans la communication intercellulaire et la progression métastatique (Forder et al., 2021; Steinbichler et al., 2017). En transférant divers cargos moléculaires (ARNm, miRNA, lncRNA, protéines), ils contribuent à la préparation de la niche pré-métastatique, à la perméabilité vasculaire et au remodelage de la matrice extracellulaire (S. Liu et al., 2019; C. Wang et al., 2024).

Sous hypoxie, l'activité des facteurs HIF, en particulier HIF-1α, module la composition et la libération des exosomes. Les exosomes dérivés de tumeurs hypoxiques sont enrichis en protéines HIF-dépendantes telles que MMP9, PDGF, PAI1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1) ou IGFBP3, qui favorisent l'angiogenèse et la réorganisation de la matrice extracellulaire (Kucharzewska et al., 2013). HIF-1α induit également l'expression de PKM2, qui, *via* la phosphorylation de SNAP23 (Synaptosomal-associated protein 23) stimule la sécrétion des exosomes (W. Luo et al., 2011; Y. Wei et al., 2017).

Parallèlement, l'hypoxie augmente la production de microvésicules *via* l'activation de RAB22A, une petite GTPase, facilitant ainsi l'invasion tumorale et la dissémination métastatique (T. Wang et al., 2014).

Les exosomes sécrétés par les cellules hypoxiques modulent plusieurs processus clés des CBNPC, notamment la glycolyse, l'angiogenèse, la migration, l'invasion et l'évasion immunitaire (X. Ji et al., 2024). Cette modulation repose en partie sur la cargaison en petits ARN non codants, parmi lesquels :

- **miR-21** : active HIF-1α et renforce la radio-résistance (S. Jiang et al., 2016),
- **miR-186-5p** : sa baisse favorise l'angiogenèse *via* l'activation de PKC-α (Becker et al., 2023),
- **miR-191** : stimule la prolifération et la migration en inhibant NFIA (J. Zhao et al., 2017),
- **lncRNA PVT1** : stabilise HIF-1α en séquestrant miR-199a-5p (H. Wang et al., 2018),
- **miR-31-5p** : favorise la transition épithélio-mésenchymateuse (J. Ren, 2023),
- **miR-129-1-3p** : sa suppression stabilise le p53 muté, soutenant la croissance tumorale et les métastases (H.-L. Yin et al., 2020).

L'hypoxie impacte également l'immunité antitumorale. Les exosomes tumoraux favorisent la polarisation des TAM vers un phénotype M2 pro-tumoral, en grande partie *via* les miR-21 et

miR-1290, amplifiant ainsi l'angiogenèse, l'invasion et la progression métastatique (Gu et al., 2023; J. Jin & Yu, 2022).

Ainsi, en hypoxie, les exosomes constituent des effecteurs majeurs de l'adaptation tumorale, en orchestrant les interactions entre cellules cancéreuses et microenvironnement immunitaire.

## 8) Hypoxie et résistance aux traitements

### *8.1) Résistance à la chimiothérapie*

Des études *in vivo* ont démontré que l'hypoxie renforce la tolérance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques, par l'activation de HIF-1α et l'induction de gènes de résistance, favorisant l'efflux des médicaments et en réduisant leur concentration intracellulaire (Z. Chen et al., 2023). Les transporteurs de type ABC, comme la P-glycoprotéine (MDR1/PGP) et la BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), activés par l'ATP, participent activement à cette expulsion des médicaments, atténuant ainsi leur effet cytotoxique (Sakata et al., 1991).

En condition hypoxique, HIF-1α favorise l'expression de ces transporteurs, tel que MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1), favorisant l'expulsion de certains médicaments des cellules ce qui accroît la résistance des cellules tumorales (Y. Lv et al., 2015; Pinzón-Daza et al., 2017). De plus, les cytokines sécrétées par les CAF activent HIF-1α, régulant ainsi plusieurs gènes pro-chimiorésistance, comme *OLFM4*, *PKM1* (impliqué dans l'OXPHOS), ainsi que des microARN tels que *miR-27a*, lequel stimule l'expression de la glycoproteine G, une pompe à efflux (X.-Z. Gao et al., 2019; Q. Zhao et al., 2015). La signalisation conjointe HIF-1α/TGF-β entraîne également une chimiorésistance dans les cellules colorectales (Y.-A. Tang et al., 2018).

HIF-2α favorise également la résistance aux traitements par l'activation des voies TGF-α/EGFR et COX-2, augmentant la résistance au sorafénib dans les cellules de carcinome hépatocellulaire hypoxiques (D. Zhao et al., 2014).

Dans les conditions hypoxiques, l'autophagie est induite et permet aux cellules tumorales bronchiques de survivre au stress provoqué par le cisplatine, en inhibant la voie de mort cellulaire (H.-M. Wu et al., 2015).

### *8.2) Résistance à la radiothérapie*

La radiothérapie agit en provoquant des dommages irréversibles à l'ADN par la génération de radicaux libres par rayonnement ionisant, un mécanisme connu sous le nom de théorie de la fixation de l'oxygène. Toutefois, l'hypoxie tumorale réduit considérablement l'efficacité de la radiothérapie, car les radicaux deviennent instables et leurs dommages sont réparables (Telarovic et al., 2021). Lorsque la pression partielle en oxygène ($pO_2$) chute sous les 10 mmHg, les cellules cancéreuses deviennent plus résistantes aux radiations, atteignant jusqu'à trois fois plus de radiorésistance à 1 mmHg (Bristow & Hill, 2008).

De plus, l'hypoxie diminue la formation de cassures double brin (DSB) de l'ADN, dommages essentiels à l'effet létal des radiations, et altère l'expression des gènes impliqués dans leur réparation (H. Zhang et al., 1995; Bristow & Hill, 2008). HIF-1α joue un rôle central en stimulant l'expression de DNA-PK, enzyme clé dans la réparation des DSB (Um et al, 2004), et son activité est elle-même augmentée par les radiations (Moeller et al., 2004). HIF-1α confère une radiorésistance *via* plusieurs mécanismes, notamment en stimulant le métabolisme de l'ATP, l'activation de p53 et la survie des cellules endothéliales (Unruh et al., 2003).

Par ailleurs, HIF-1α favorise l'activation des voies EGFR et NRF2 médiée par la sécrétion de facteurs par les cellules tumorales, améliorant la résistance des cellules voisines aux radiations (Suwa et al., 2021). La mort des cellules endothéliales provoquée par la radiothérapie peut induire une mort secondaire des cellules tumorales (Semenza, 2004). Toutefois, la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques tels que VEGFA, FGF et PDGF par les cellules cancéreuses protège les cellules endothéliales de la cytotoxicité des rayons (M. B. Nilsson et al., 2021). Ainsi, des inhibiteurs de ces facteurs peuvent améliorer la réponse à la radiothérapie Lund et al., 2000). La réoxygénation des cellules cancéreuses hypoxiques améliore également leur radiosensibilité (B.-J. Hong et al., 2016).

## C. Hypoxie et voie Hippo

### 1) CTGF, médiateur entre HIF et YAP-1/TAZ

En condition d'hypoxie, HIF-1α induit l'expression de plusieurs gènes, dont CTGF (*connective tissue growth factor*), qui contribue à la fois à l'adaptation cellulaire et à la progression

tumorale (Z. Chen et al., 2020; H. Kim et al., 2021). CTGF module l'activité de la voie Hippo par plusieurs mécanismes (*Figure 16*) :

- Remodelage de la MEC : CTGF augmente la rigidité tissulaire, inhibant les kinases MST1/2 et LATS1/2. Cela diminue la phosphorylation de YAP-1/TAZ et favorise leur activation (Z. Chen et al., 2020).
- Activation de la voie TGF-β : CTGF stimule les protéines SMAD, qui interfèrent avec la cascade Hippo, réduisant encore la phosphorylation de YAP-1/TAZ (H. Yang et al., 2024).
- Interaction avec les intégrines : CTGF active les voies FAK/RhoA, induisant un remodelage du cytosquelette et activant indirectement YAP-1/TAZ (W. Jiang et al., 2021).
- Activation des voies PI3K/AKT et MAPK/ERK, qui soutiennent également l'activité de YAP-1/TAZ (Ou et al., 2020).

Notamment, CTGF est lui-même une cible transcriptionnelle de YAP-1/TAZ, suggérant l'existence d'une boucle de rétroactivation positive entre HIF, CTGF et la voie Hippo.

### 2) Interactions entre HIF-1α et YAP-1/TAZ

Une interaction directe existe entre la voie Hippo et la voie des HIF. En effet, YAP-1 et HIF-1α peuvent interagir et facilitant leur translocation nucléaire (X. Zhang, Li, et al., 2018). Une fois dans le noyau le complexe YAP-1/HIF1 α régule l'expression génique de gènes impliqués dans la survie cellulaire, l'adaptation au stress hypoxique et la tumorigenèse (Y. Zhao et al., 2023). De plus, TAZ et HIF-1α peuvent également interagir ensemble, stimulant l'activité TAZ/TEAD (L. Xiang et al., 2015). L'interaction entre HIF-1α et TAZ est bidirectionnelle puisque TAZ permet également l'activation de HIF-1α (Bendinelli et al., 2013). Ces données concordent avec le fait que YAP-1 et HIF-1 partagent plusieurs cibles transcriptionnelles communes (PKM2, GLUT1, PDK1, CTGF, VEGFA…) (*Figure 16*).

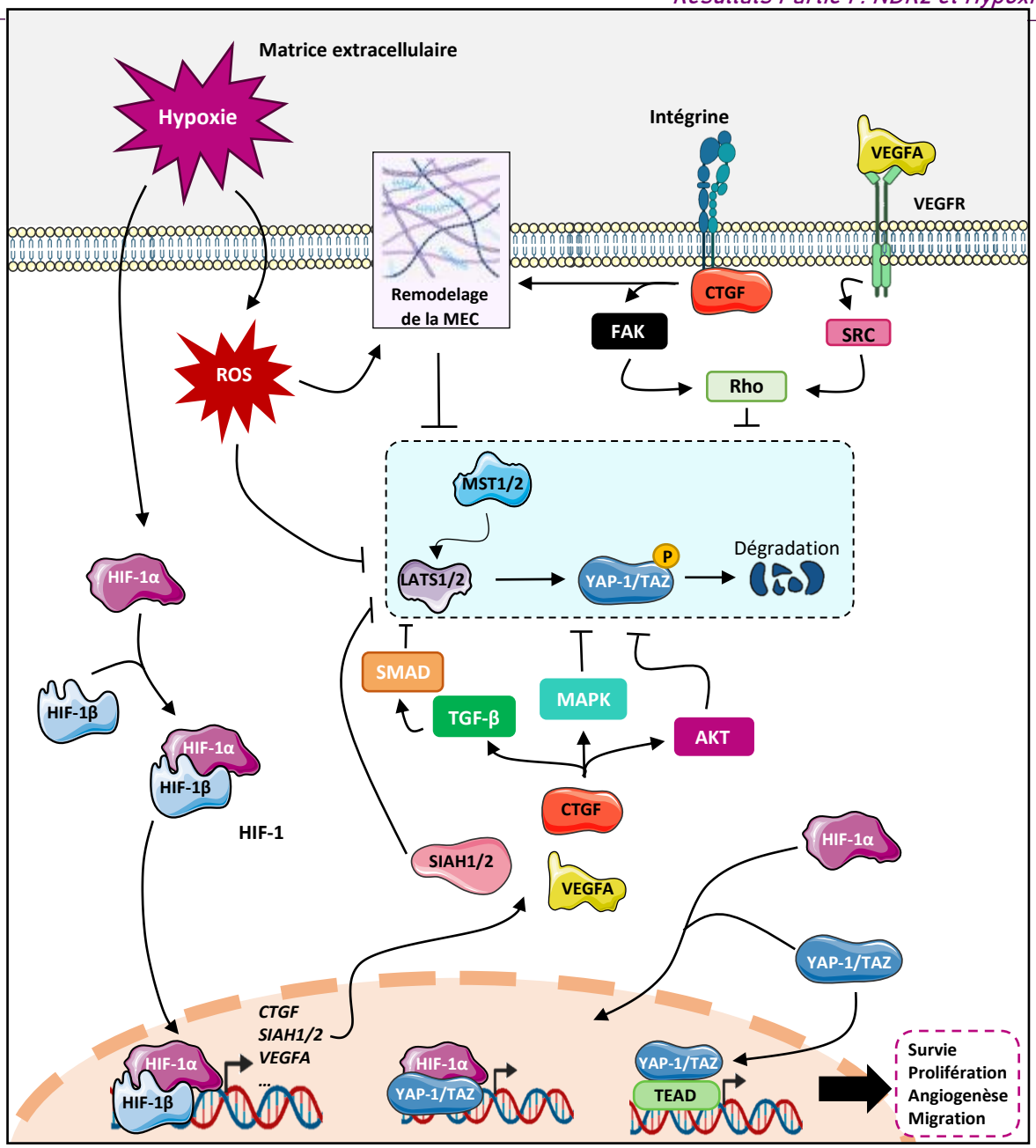



***Figure 16 : Régulation de YAP-1/TAZ par l'hypoxie dans le contexte tumoral***

*En conditions hypoxiques, le facteur inductible par l'hypoxie 1-alpha (HIF-1α) est stabilisé dans le cytoplasme, échappant à sa dégradation protéasomale. Il forme alors un hétérodimère avec HIF-1β pour constituer le complexe HIF-1, qui transloque vers le noyau. Ce complexe se lie aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) présents dans les promoteurs de gènes cibles afin d'induire leur transcription. Parmi ces gènes figurent notamment CTGF, VEGFA et SIAH1/2, tous impliqués dans la régulation du développement tumoral.*

*CTGF (Connective Tissue Growth Factor) active plusieurs voies de signalisation oncogéniques telles que AKT, MAPK et TGF-β, entraînant la répression de la voie Hippo et favorisant ainsi l'activation de YAP-1/TAZ. CTGF interagit également avec les intégrines, modulant l'architecture de la matrice extracellulaire (MEC) et du cytosquelette via les protéines Rho, ce qui inhibe encore davantage la voie Hippo.*

*VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A), en se liant à son récepteur VEGFR, stimule également les protéines Rho, induisant des réarrangements cytosquelettiques qui participent à l'activation de YAP-1/TAZ.*

*SIAH2, un facteur E3 ligase induit par l'hypoxie, favorise la dégradation des protéines LATS1/2, kinases centrales de la voie Hippo, renforçant ainsi l'activation de YAP-1/TAZ.*

*L'hypoxie génère une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui participent au remodelage de la MEC et inhibent également les kinases MST1/2 et LATS1/2, renforçant encore l'inactivation de la voie Hippo.*

*Tous ces mécanismes convergent vers une activation nucléaire de YAP-1/TAZ, favorisant la transcription de gènes pro-tumoraux. De plus, YAP-1/TAZ peuvent interagir directement avec HIF-1α, coordonnant ainsi les réponses à l'hypoxie avec la progression tumorale. Cette cascade d'événements contribue à l'invasion tumorale, l'angiogenèse, le remodelage du microenvironnement tumoral et la progression maligne.*

### 3) Les protéines SIAH1/2 : inhibition de LATS2 et activation de YAP-1/TAZ

Sous hypoxie, HIF-1 permet la transcription de SIAH1 (Seven in Absentia Homolog 1), une ubiquitine E3 Ligase, qui cible LATS2 induisant sa dégradation *via* le protéasome (L. Xiang et al., 2014). Cela permet l'activation de TAZ, entrainant l'expression de ses gènes cibles impliqués dans le phénotype souches (L. Xiang et al., 2014). Cependant, cette interaction SIAH1–LATS2 est sujette à controverse, car une autre étude n'a pas confirmé cette interaction, suggérant que ces divergences pourraient résulter des différences entre les modèles cellulaires utilisés (HEK293T vs MDA-MB-231) ou des conditions expérimentales variées (B. Ma et al., 2015).

Son homologue SIAH2 cible également LATS2 pour dégradation, interaction amplifiée en hypoxie (B. Ma et al., 2015) (*Figure 16*). De plus, la zyxine, induite par TGF-β lors d'une hypoxie, stabilise un complexe zyxine–SIAH2–LATS2, activant alors YAP-1, la TEM et la migration des cellules cancéreuses (B. Ma et al., 2016).

### 4) VEGFA : médiateur angiogénique entre HIF et YAP-1/TAZ

VEGFA et son récepteur sont des régulateurs clé de l'angiogenèse tumorales (Hicklin & Ellis, 2005). VEGFA est une cible transcriptionnelle de HIF et est impliqué dans la tumorigenèse hypoxie dépendante (Zhu & Zhang, 2018). Des études ont établi un lien entre l'activation de VEGFA/VEGFAR et celle de YAP-1/TAZ. L'activation de YAP-1 et TAZ par VEGFA se fait par deux mécanismes principaux (X. Wang et al., 2017; Azad et al., 2018) :

- Inhibition de MST1/2-LATS1/2 par PI3K/MAPK, entrainant une translocation nucléaire de YPA/TAZ et leur activation
- Remaniement du cytosquelette d'actine par VEGFAR2, *via* l'activation de Src kinases et de Roh GTPases, induisant la migration cellulaire et l'angiogenèse

Cependant, l'effet du VEGFAR2 varie selon les cellules cibles et les ligands impliqués.

Ces données appuient l'hypothèse selon laquelle les VEGFA constituent un lien fonctionnel central entre HIF et YAP-1/TAZ. De plus, la translocation nucléaire de YAP-1 induite par l'hypoxie stabilise HIF-1α et augmente la transcription de VEGFAA (X. Zhang, Li, et al., 2018).

Cela suggère une boucle de rétroactivation HIF–VEGFA–YAP-1/TAZ renforçant la croissance tumorale (*Figure 16*).

### 5) RCPG : lien entre hypoxie, YAP-1/TAZ et HIF-1α

Les RCPG modulent aussi la voie Hippo. En réponse à la liaison de ligands, les RCPG associés aux protéines G G12/13, Gq/11, et Gi/o activent les Rho GTPases, induisant un remaniement du cytosquelette d'actine et inhibant la cascade MST1/2–LATS1/2. Cela conduit à la translocation nucléaire de YAP-1/TAZ et à l'activation de leurs gènes cibles (F.-X. Yu et al., 2012). Dans un contexte hypoxique, certains RCPG interagissent avec HIF-1α favorisant la reprogrammation métabolique, la motilité et la prolifération tumorale (Lee et al., 2013; Cheong et al., 2016). Ces données suggèrent que les RCPG pourraient faire le lien entre HIF-1α et YAP-1/TAZ.

Parmi eux, GPRC5A, un RCPG orphelin, est identifié comme cible transcriptionnelle directe de HIF (Greenhough et al., 2018), dont l'expression augmente en hypoxie. GPRC5A inhibe l'activité de LATS *via* l'activation de RhoA, réduisant la phosphorylation inhibitrice de YAP-1 et favorise sa localisation nucléaire et son activité transcriptionnelle (H. W. Park et al., 2015). Une boucle de rétrocontrôle positive est suggérée : YAP-1 activé favoriserait à son tour l'expression de GPRC5A, formant un axe HIF–GPRC5A–YAP-1 crucial pour l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie, notamment dans le cancer colorectal. Ce mécanisme est associé à une moindre survie sans événement chez les patients (Greenhough et al., 2018).

## II – L'activation de NDR2 induite par l'hypoxie tumorale contribue à la formation des métastases cérébrales du cancer bronchique non à petites cellules

Comme mentionné précédemment, l'hypoxie représente une composante essentielle du microenvironnement tumoral, jouant un rôle clé dans l'agressivité et le potentiel invasif des CBNPC. Dans ce contexte, notre étude s'est focalisée sur l'interconnexion entre les voies de signalisation HIF et Hippo ainsi que sur leur contribution potentielle à la formation des métastases cérébrales.

CDDpress

www.nature.com/cddis

ARTICLE OPEN

# Hypoxia-induced activation of NDR2 underlies brain metastases from Non-Small Cell Lung Cancer

Jérôme Levallet[1], Tiphaine Biojout[1], Céline Bazille[1,2], Manon Douyère[1], Fatéméh Dubois[1,2,3], Dimitri Leite Ferreira[1,4], Jasmine Taylor[1], Sylvain Teulier[1,4], Jérôme Toutain[5], Nicolas Elie[6], Myriam Bernaudin[5], Samuel Valable[5], Emmanuel Bergot[1,4] and Guénaëlle Levallet[1,2,3]✉

© The Author(s) 2023

The molecular mechanisms induced by hypoxia are misunderstood in non-small cell lung cancer (NSCLC), and above all the hypoxia and RASSF1A/Hippo signaling relationship. We confirmed that human NSCLC ($n = 45$) as their brain metastases (BM) counterpart are hypoxic since positive with CAIX-antibody (target gene of Hypoxia-inducible factor (HIF)). A severe and prolonged hypoxia (0.2% O2, 48 h) activated YAP (but not TAZ) in Human Bronchial Epithelial Cells (HBEC) lines by downregulating RASSF1A/kinases Hippo (except for NDR2) regardless their promoter methylation status. Subsequently, the NDR2-overactived HBEC cells exacerbated a HIF-1A, YAP and C-Jun-dependent-amoeboid migration, and mainly, support BM formation. Indeed, NDR2 is more expressed in human tumor of metastatic NSCLC than in human localized NSCLC while NDR2 silencing in HBEC lines (by shRNA) prevented the xenograft formation and growth in a lung cancer-derived BM model in mice. Collectively, our results indicated that NDR2 kinase is over-active in NSCLC by hypoxia and supports BM formation. NDR2 expression is thus a useful biomarker to predict the metastases risk in patients with NSCLC, easily measurable routinely by immunohistochemistry on tumor specimens.

*Cell Death and Disease* (2023)14:823 ; https://doi.org/10.1038/s41419-023-06345-3

## INTRODUCTION

Hypoxia (oxygen deprivation) supports genomic instability, aggressiveness of tumor cells, formation of metastases, and resistance to treatment by non-small-cell lung cancers (NSCLC) [1–3] by incompletely established mechanisms. One can hypothesize that hypoxia disrupts the RASSF1A (Ras association domain family 1 isoform A)/Hippo signaling pathway [4–9] since YAP is active in several hypoxic tumors [10] and interact either with **(i)** hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1A) to promote pancreatic ductal adenocarcinoma invasion [9] or hepatocellular carcinoma cell glycolysis under hypoxic stress [11], or with **(ii)** HIF-2A to promote the progression of colon cancer [12]. Regarding NSCLC, that hypoxia could disrupt the RASSF1A/Hippo signaling pathway, is of particular interest since Hippo pathway is already known to be altered following the loss of expression of RASSF1A in 25% of patient with NSCLC [13], leading to aberrant activation of both the Hippo kinase, NDR2 and the Hippo effector, YAP [14] and supporting the subsequent initiation and dissemination of NSCLC [14, 15]. Only one paper reports the role of RASSF1A-HIF-1A loop, in a subset of NSCLC still expressing RASSF1A and the primary cancer cells isolated from the same tumors, independent of Hippo signaling [16]. Here, we decipher the HIF-1A/YAP/TAZ relationship in presence or absence of RASSF1A in Human Bronchial Epithelial Cells (HBEC) lines grown under severe (0.2% $O_2$) and prolonged (48 h) hypoxia (i.e. as conditions present in the core/bulk of lung tumor [17–19]). We seek to determine whether NDR2 is hyperactivated early (following epigenetic dysregulation) or late (by hypoxia) during the natural history of NSCLC and could be a useful tool to diagnose metastatic tumors in view of these pro-migratory properties.

## RESULTS

### Human primitive NSCLC as their brain metastases are hypoxic

The H-Score of carbonic anhydrase 9 (CAIX), a transcriptional target of HIF-1A [20], is similar between primary tumors of patients with localized NSCLC (62.4 ± 12.3) or metastatic NSCLC (71.2 ± 19.7), and comparable between primary tumors and brain metastasis (65.4 ± 17.1, $n = 20$) from the same patients (Fig. S1).

### Hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h) activates YAP but not TAZ in HBEC lines

HBEC-3 (Fig. S2) as the other HBEC lines (Fig. S3) survive to a hypoxia (48 h, 0.2% $O_2$, confirmed by the nuclear accumulation of HIF-1A (HBEC-3: Fig. S2A, A549: S2B)) but reach confluence slowly than in normoxia (HBEC-3: Fig. S2C; A549: Fig. S2D) since then apoptosis increases (Caspase3/7 activity, HBEC-3: Fig. S2E, A549:

[1]Université de Caen Normandie, CNRS, Normandie Université, ISTCT UMR6030, GIP CYCERON, Caen F-14074, France. [2]Department of Pathology, CHU de Caen, Caen F-14000, France. [3]Structure Fédérative D'oncogénétique cyto-MOléculaire du CHU de Caen (SF-MOCAE), CHU de Caen, Caen F-14000, France. [4]Department of Pulmonology & Thoracic Oncology, CHU de Caen, Caen F-14000, France. [5]CNRS, Université de Caen Normandie, Normandie Université, ISTCT UMR6030, GIP CYCERON, Caen F-14074, France. [6]Normandie Univ, UNICAEN, Federative Structure 4207 "Normandie Oncologie", Service Unit PLATON, Virtual'His platform, Caen, France; Normandie Univ, UNICAEN, Service Unit EMERODE, Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, CMABio[3], Caen, France. ✉email: guenaelle.levallet@unicaen.fr

Edited by Professor Stephen Tait

Received: 27 July 2023 Revised: 12 November 2023 Accepted: 27 November 2023
Published online: 13 December 2023

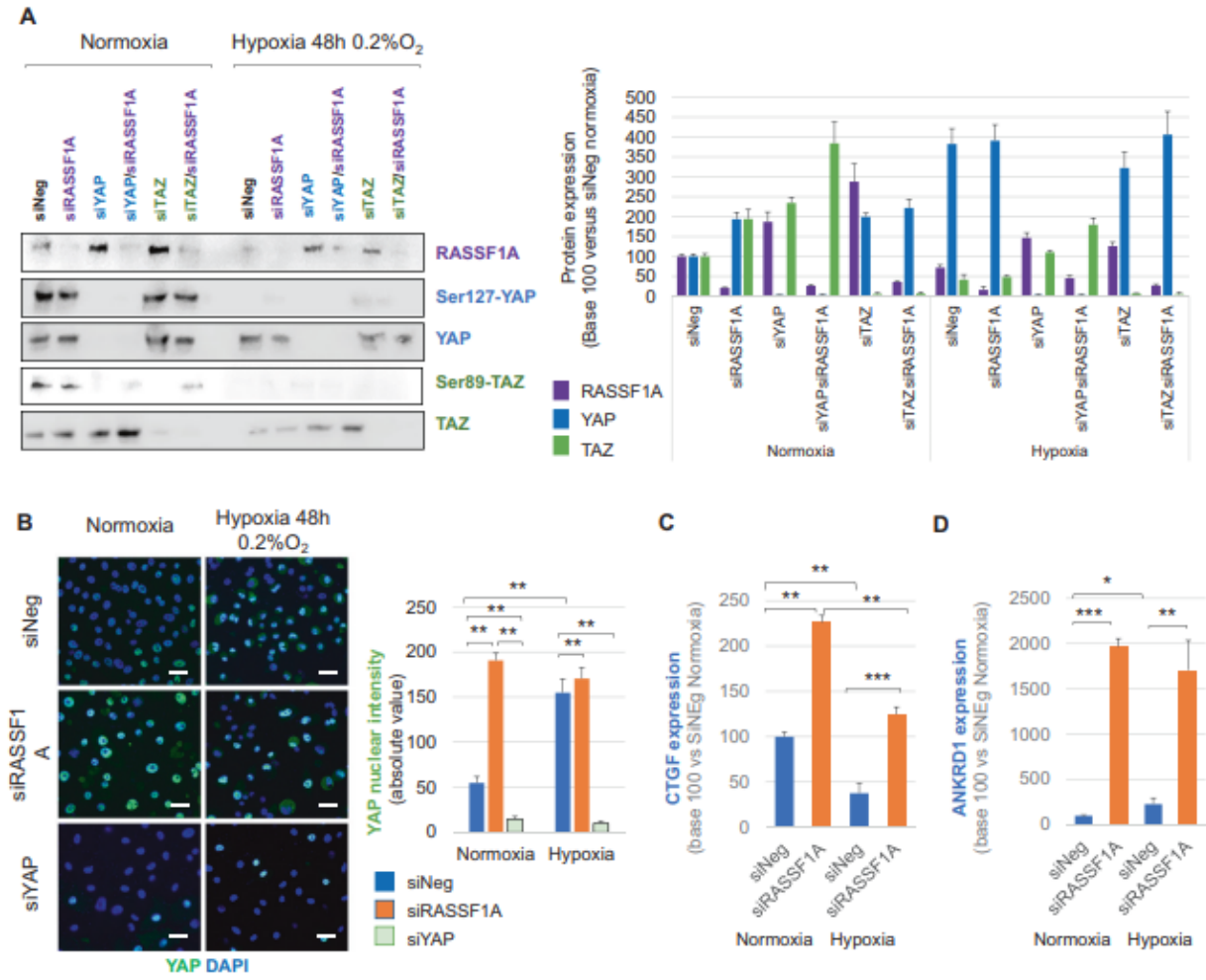



**Fig. 1 Severe and prolonged hypoxia activates YAP and downregulates TAZ in HBEC-3 cells. A** Western blot of members of the Hippo pathway on HBEC-3, expressing or not RASSF1A, after 48 h of normoxia/hypoxia and associated quantification (right panel). **B** Immunostaining of YAP on HBEC-3 expressing or not RASSF1A and YAP, after 48 h of normoxia/hypoxia and Graphic representation of YAP nuclear intensity. **C, D** Representations of the mRNAs expression of the target genes of YAP: CTGF (**C**) and ANKRD1 (**D**). P-value $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ (SEM $n \geq 3$).

Fig. S2F). However, HBEC-3 cells (Fig. S2G) as A549 cells (Fig. S2H) still incorporate BrdU between 24 and 48 h.

Hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h) increases dephosphorylated YAP protein while the expression of TAZ drastically decreases in HBEC-3 (Fig. 1A). In line, hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h) increases the YAP nuclear intensity like the RASSF1A depletion without additive effect between these two events (Fig. 1B) while TAZ nuclear signal decreases (Fig. S4). The RASSF1A depletion, which causes the nuclear translocation of active YAP in HBEC-3 cells [15], significantly increases the expression of these two target genes of YAP [21, 22] (*CTGF* (Fig. 1C) and *ANKRD1* (Fig. 1D)) confirming that YAP is active when the HBEC-3 cells are in hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h). TAZ decrease (Western-Blot: Fig. S5A, B, C, immunofluorescence: Fig. S5H) but YAP accumulation (Fig. S5A, D, E) and activation (YAP nuclear accumulation: Fig. S5F; *CTGF* and *ANKRD1* expression: Fig. S5G) were also reported in others HBEC cells grown in hypoxia (0.2% $O_2$, confirmed by HIF1-A nuclear accumulation (Fig. S5I).

### Hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h) downregulated RASSF1A/kinases Hippo in HBEC lines except for NDR2

Hypoxia (0.2% $O_2$ for 48 h) decreases the expression of YAP's kinases MST1, LATS1, and NDR1/2 mRNA in RASSF1-depleted or not HBEC cells with (Fig. 2A), however, at protein level, NDR2 is preserved (Fig. 2B). In line, NDR2 kinase expression is not significantly modified by hypoxia, whatever the cell line considered (Fig. S6A, E). Hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h) decreases Hippo kinases, except NDR2, without changing the methylation status of the promoters of their genes or of the target gene of YAP, *ANKRD1*, known to be inactivated/hypermethylated in NSCLC [8, 22] (HBEC-3: Fig. S7A, A549: Fig. S7B).

### Hypoxia (0.2% O2, 48 h) exacerbates the ability of NDR2-overactived NSCLC cells to perform a YAP/C-Jun and HIF-1A-dependent amoeboid migration

HBEC-3 cells grown in hypoxia are individualized and adopted stretched and/or even branched positions (Fig. 3A). We evaluate the effect of this hypoxia on the epithelial-mesenchymal transition, the adherent and communicating junctions and the elasticity of HBEC-3 cells by measuring the expression of E- and N-Cadherins [23], connexin-43 [24], and fascin [25] (Fig. 3B–D). E-cadherin (epithelial marker) decreases while *N*-Cadherin (mesenchymal marker) increases in HBEC-3 cells placed in hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h) compared to cells cultured in normoxia but not in RASSF1A- and/or NDR2-depleted HBEC-3 cells (Fig. 3B, RASSF1A and/or NDR2 depletion are confirmed by RASSF1A (Fig. S8A)

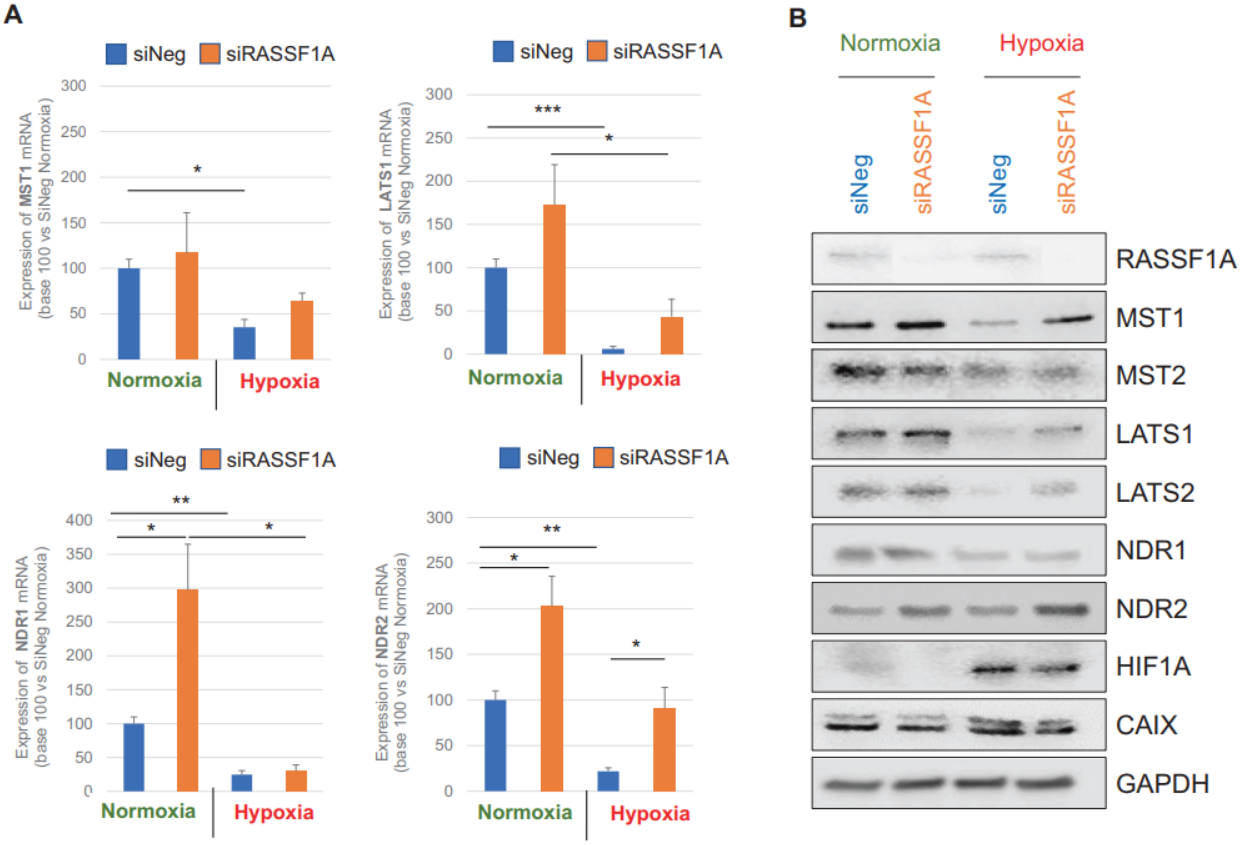



**Fig. 2 Severe and prolonged hypoxia preserves NDR2 protein expression but decreases expression of other Hippo pathway kinases in HBEC-3 cells. A** Graphic representation of the mRNAs expression of the kinases of the Hippo pathway MST1, LATS1 and NDR1/2 (A-D) by qPCR on the HBEC-3 cells. *P*-value $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ (SEM $n \geq 3$). **B** Western blot of Hippo pathway members in HBEC-3 cells, expressing or not RASSF1A, after 48 h of normoxia / hypoxia (representative experiment).

and/or (Fig. S8B) NDR2 expression assay). In line, in hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h), fascin increases in HBEC-3 cells but not in RASSF1A- and/or NDR2-depleted HBEC-3 cells (Fig. 3C). Finally, connexin-43 decreases in hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h) in HBEC-3 cells with or without RASSF1A and/or NDR2 expression (Fig. 3D).

Control HBEC-3 cells (siNeg), grown in hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h), adopt an individual migration mode while their migration is collective in normoxia (Fig. 4A). This migration is of amoeboid type for the "control" cells (Fig. 4B) while mesenchymal for RASSF1A-depleted HBEC-3 cells (Fig. 4B). Since the type of migration (individual *versus* collective) influences the cell velocity [26], we measured the average velocity using the TrackMate module of the Fiji® software. These analyzes demonstrate that hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h), like the inactivation of RASSF1A, significantly increases the migration speed of HBEC-3 cells without additive effect (Fig. 4A). We evaluate the route of these cells using the MtrackJ® module of the Fiji® software, and show that compared to HBEC-3 cells in normoxia, HBEC-3 cells in hypoxia move randomly above all when depleted for RASSF1A (Fig. 4C).

Hypoxia and RASSF1A depletion exhibit similar effect on increasing the velocity of HBEC-3 cells. Inactivation of YAP partly prevents the gain in migration velocity induced by RASSF1A depletion of HBEC-3 cells grown in hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h). As HIF-1A leads cell movements [27], *HIF-1A* expression was thus assessed in HBEC-3 at 48 h normoxia/hypoxia (protein level: Fig. 5A, B; mRNA level: Fig. 5C). RASSF1A depletion increases *HIF-1A* mRNA while this expression was significantly reduced in HBEC-3 cells grown in hypoxia (Fig. 5C).

Hypoxia and/or RASSF1A and/or YAP depletion activates the hypoxia factor HIF-1A. Indeed, the presence of nuclear HIF-1A in HBEC-3 cells at high cell density is reported whether cultured in normoxia or hypoxia (Fig. 5A). RASSF1A and/or YAP silencing enhances the nuclear intensity of HIF-1A but not in the absence of NDR2 (Fig. 5B). In line, hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h) increases the expression of *CAIX* (target gene of HIF-1A [28]) mRNA in HBEC-3 cells (Fig. S9) all the more so when cells are depleted for RASSF1A and/or YAP (Fig. S9).

The involvement of c-Jun in the positive effect of hypoxia on NDR2 and YAP was evaluated with an inhibitor of JNK, the SP600125. Indeed, c-Jun (1) is involved in cell motility, invasion and TEM [29–31], (2) cooperates with HIF-1 in hypoxia-induced gene transcription [32], (3) protects HIF-1A from degradation and is induced by prolonged or chronic hypoxia [33, 34], (4) is repressed by RASSF1A in lung cells [35], and (5) is a transcription factor for both YAP-1 (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=YAP1) and ARNT (https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ARNT).

In normoxia, the RASSF1A depletion increases phospho-c-Jun in HBEC-3 cells, while YAP and/or NDR2 silencing decreases phospho-c-Jun/c-Jun ratio and abrogates effect of RASSF1A depletion (Fig. 6A). In hypoxia, none of these effects are observed as, when cells were pre-treated with SP600125, a repressor of c-Jun activation. RASSF1A depletion significantly increases the HBEC-3 cells velocity (Fig. 6B) and 3D-migration (Fig. 6C) while hypoxia increases HBEC-3 cells velocity but decreases 3D-migration. YAP as NDR2 increases the velocity and migration induced by RASSF1A depletion in normoxia (Fig. 6B). In hypoxia, the increase of cell velocity and the decrease of 3D migration is still observed in the absence of RASSF1A and/or YAP expression but not in the absence of NDR2 (Fig. 6B). The inhibition of c-Jun

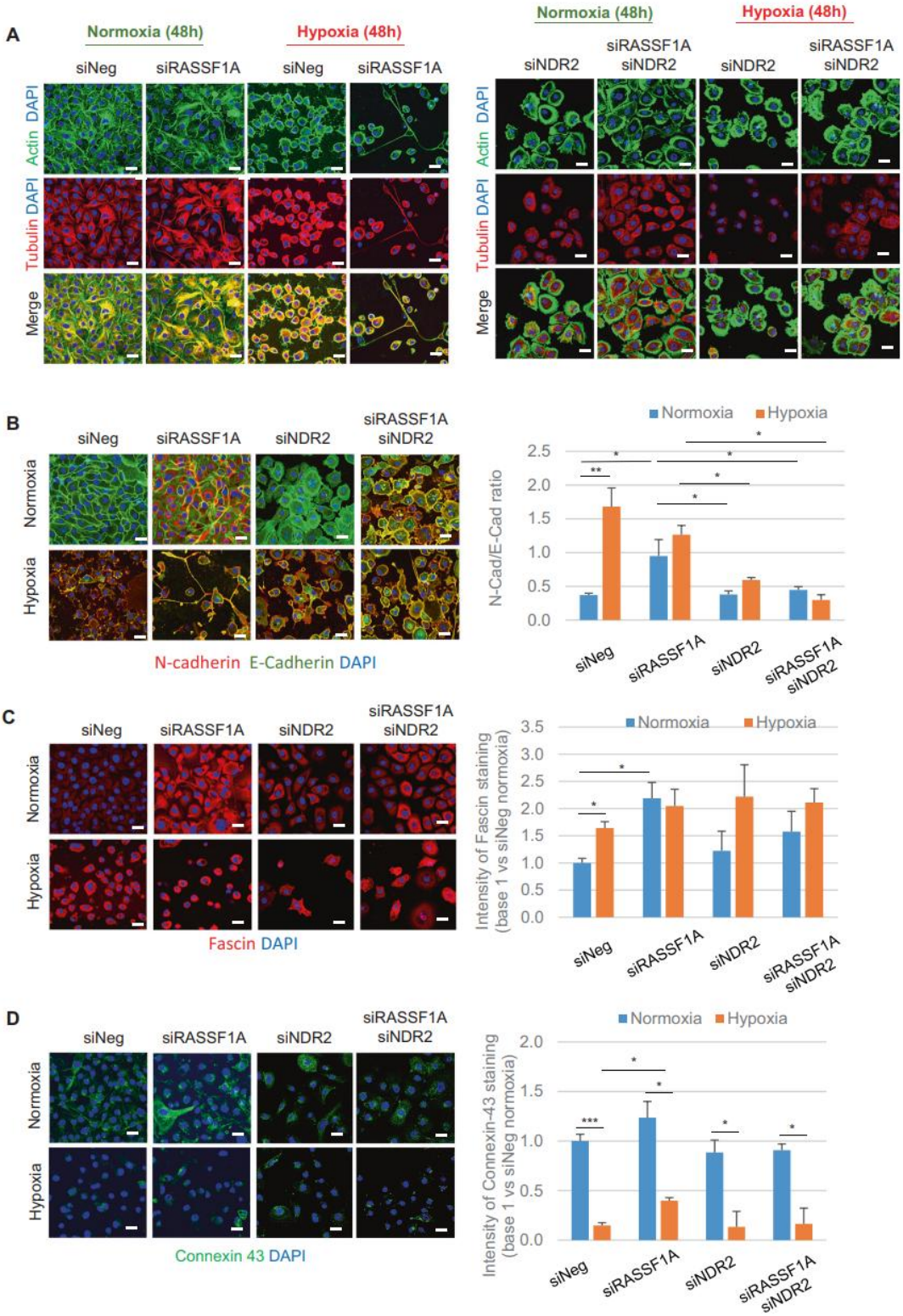
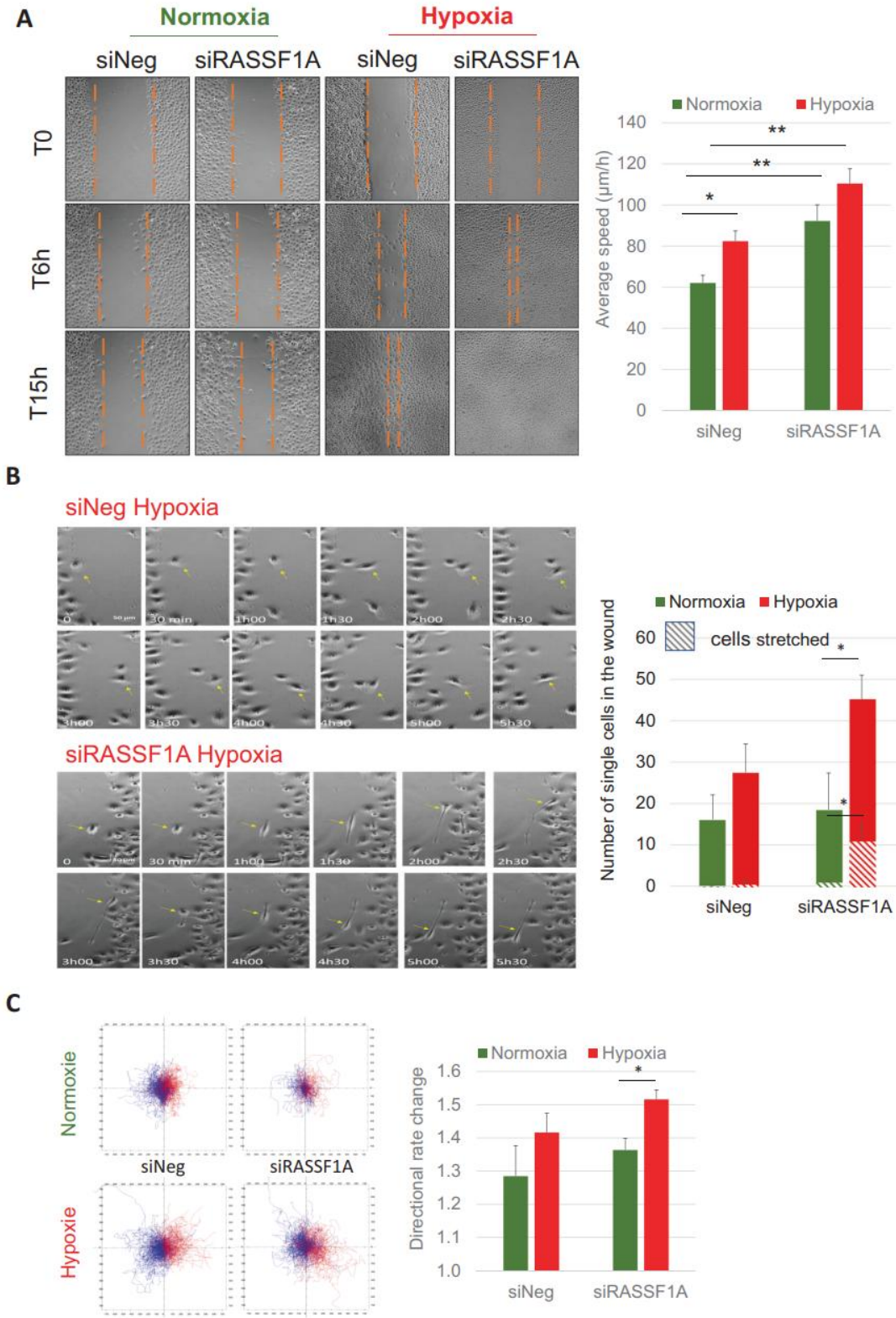



**Fig. 3 Severe and prolonged (0.2% $O_2$, 48 h) hypoxia leads to epithelial-mesenchymal transition and cell junctions disrupt of HBEC-3 cells. A–D** Immunostaining on HBEC-3 expressing or not RASSF1A and/or NDR2 after prolonged culturing (48 h) in normoxia/hypoxia showing (**A**) elements of the cytoskeleton, actin (green) and tubulin (red), (**B**) the N-cadherin (in red) and E-cadherin (green), (**C**) fascin (red), and (**D**) connexin 43 (Cx43) (green) (bare Scale 40 µm; $n = 3$). *P*-value $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (SEM $n \geq 3$).




activation abrogates or reduces the effects of RASSF1A depletion or hypoxia on HBEC-3 cell velocity (Fig. 6B) and 3D (Fig. 6C) migration respectively (NDR2 and/or RASSF1A depletion are confirmed by NDR2 (Fig. S10A) and/or RASSF1A (Fig. S10B) expression assay).

**NDR2 silencing strongly inhibits the xenograft formation and growth in a mice brain metastases model**

We use a lung cancer-derived brain metastases (BM) model in mice, and inoculated H2030-BrM3 cells (shControl, shNDR1 or shNDR2 (Fig. 7A–C)), in the right caudate putamen of Nude

**Fig. 4 Severe and prolonged (0.2% $O_2$, 48 h) hypoxia leads to elasticity increase of HBEC-3 cells and thus to increase in individual type migration. A**, **B** Illustrations of the wound healing assay with HBEC-3 expressing or not RASSF1A, taken by inverted phase-contrast microscope (×10 magnification) in normoxia/hypoxia, at T0, T6 and T15h after scraping (**A**), zooming in on cell migration for conditions siNeg-hypoxia (**B**, upper panel) and siRASSF1A-hyopoxia (**B**, lower panel). **A** The average cell velocity (in µm/h) was measured in normoxia and hypoxia for the control conditions, in the absence of RASSF1A. *P*-value $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ (SEM $n \geq 3$). **C** Diagram representing the migration and the change of direction of HBEC-3, with in red the cells of the right edge of the wound and in blue those of the left edge (>300 cells) using the MtrackJ® module of the Fiji® software. Histograms represent directional rate change (i.e. change of angle between two coordinates (x, y) of the same cell at two different times) evaluated by TrackMATE® module of the Fiji® software for near 1000 cells per movie (SEM $n \geq 3$). *P*-value $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

athymic mice ($n = 10$ per condition). At day 18, BM were observed in 6/10 and 7/10 animals in shControl and shNDR1 group respectively but not in shNDR2 group (Fig. 7D). At day 24, BM reached $36.22 \pm 5.8\ mm^3$ in shNDR1 group and $18.73 \pm 4.5\ mm^3$ in the shControl one (Table 1). In shNDR2 group, 6 animals started to developed BM at day 24, with significantly lower average volume ($2.84 \pm 0.9\ mm^3$) compared to shControl and shNDR1 group (Representative image: Fig. 7D, all mice brain: Fig. S11). Immunostaining confirmed the lower expression of NDR1 and of NDR2 in BM of respective experimental groups (Fig. 7E). Comparable responses were obtained with the A549 xenograft (Table 1).

Furthermore, we observed a reduction of the nuclear staining of phospho-C-Jun and YAP in BM of shNDR2 group (Fig. 7F). In these cells, expression of YAP target genes (ANKRD1/CTGF) was reduced in comparison to the shControl or shNDR1 cell expression (Fig. 7G).

**NDR2 is more expressed in metastatic than in localized NSCLC**

We assay NDR2, YAP and phospho-c-Jun expression in 25 patients with localized cancer and 20 patients with metastatic cancer (Fig. 8A–C). NDR2 is more expressed in tumor of metastatic NSCLC (H-score: $193.2 \pm 5.8$) than in localized NSCLC ($136{,}4 \pm 10{,}7$). There was no difference in the expression of NDR2 between the primary and BM tumors of the same patients with NSCLC.

The nuclear YAP or phospho-c-Jun H-Score are similar between primary tumors of patients with localized NSCLC (YAP: $27.1 \pm 11.6$, phospho-c-Jun: $12.5 \pm 5.3$) and those with metastatic NSCLC (YAP: $21.9 \pm 9.2$, phospho-c-Jun: $9.8 \pm 5.4$). However, nuclear YAP or phospho-c-Jun are 2-fold higher in BM (YAP: $53.3 \pm 8.6$, phospho-c-Jun: $38.0 \pm 9.7$) than in primary tumor of patients with metastatic NSCLC.

## DISCUSSION

We hypothesized that a hypoxic tumor microenvironment could contribute to the inactivation of the RASSF1A/Hippo pathway during bronchial tumor growth and underlies brain metastases formation. We first confirm that human primitive NSCLC as their brain metastases are hypoxic [20, 36–40]. Then, we report the ability of human bronchial epithelial cell (HBEC) lines expressing (HBEC-3, BEAS-2B) or not RASSF1A (A549, H1299, H1915, H2030-BRM3) to survive severe hypoxia at 0.2% oxygen which is consistent with the work having maintained cultures of HBEC in hypoxia (1% oxygen) for up to 28 days in an air-liquid interface [41].

We discovered that hypoxia inactivates TAZ in HBEC-3 cells but leads to the accumulation of active (dephosphorylated) nuclear YAP. Such results were recovered for the other HBEC lines with a few exceptions for BEAS-2B, H1299, and H1915 cell lines. For the BEAS-2B, this can be explained by the high basal level of YAP expression, probably due to their immortalization by SV40, an inhibitor of p53 which leads to the activation of YAP [42] which may not further increase. Under hypoxia, YAP is active in HBEC lines. That hypoxia act differently on YAP and TAZ was already described in ovarian cancer (5. The activation of YAP by hypoxia is supported by the silencing of its negative regulators: RASSF1A and Hippo kinases but not NDR2. That hypoxia inhibits Hippo kinases and promotes the nuclear localization of YAP as well as its transcriptional activity had already been reported in breast cancer [12], the liver [11], the colon [43], the pancreas [9], or the ovary [5] but not yet in lung cancer. Since hypoxia could influence the Hippo pathway through epigenetic modifications [8], we determined the methylation status of promoters of genes encoding members of the RASSF1A/Hippo pathway. We show that hypoxia does not induce methylation of the promoters from Hippo kinases or *ANKRD1* genes (ANKRD1 was studied since [22] reported frequent methylation of the promoter of this gene in bronchial tumors and that we observed a very strong transcription of this gene following hypoxia) nor does it demethylate the RASSF1A promoter in A549 cells. The decrease in expression of RASSF1A and of the kinases of the Hippo pathway induced by hypoxia does not therefore imply a modification of the methylation status of the promoters of the genes encoding these proteins. The mechanism of action remains to be determined but could involve ubiquitin-dependent regulations, as described in the breast cancer model in which SIAH2 directs the LATS2 kinase to the proteasome [7]. Indeed, all the members of the Hippo pathway are subject to regulation by ubiquitinylation [44].

YAP is described to transcribe genes involved in TEM and cell movement [15]. We evaluated the effect of hypoxia on the cytoarchitecture of HBEC-3 cells, their TEM and their 2D motility). The immunostaining of the actin and tubulin filaments confirmed that the RASSF1A depletion alters the cells morphology which become large or stretched in normoxia [15]. Here, we report in an original way that the alteration in cell morphology is enhanced when cells are grown under severe hypoxia. Again, that hypoxia alters the morphology of bronchial cells is in agreement with the work which reports that hypoxia affects the differentiation of HBEC in vitro: HBEC cells cultured at an air-liquid interface do not more succeed in forming cilia at their apex, and adopt a mucoid phenotype [41]. This change in morphology is in line with (i) the T (EM that we report in parallel in these cells, (ii) the fact that they undo their cell junctions (adherent and communicating), and (iii) the fact that they strongly express fascin, molecule known for its involvement in the formation of filopodia (fine cytoplasmic extensions) but also in the extensibility of cells [25] as well as cell migration [45]. This morphological/phenotypic change explains why HBEC adopt an individual type of migration when cultured in hypoxia and when they are brought to fill a mechanical wound made on their cell layer while in normoxia, their migration is collective. The hypoxia-induced amoeboid migration has only been described once to date and to our knowledge in a head and neck cancer model and is linked to HIF-1A [46]. We also observe that the HBEC grown in hypoxia do not efficiently repair the wound: HBEC move faster in hypoxia than in normoxia, but do not only migrate toward the other bank, particularly RASSF1A-depleted HBEC. This disorganized migration could be explained by the fact HBEC-3 cells grown in hypoxia and depleted for RASSF1A that strongly express the fascin which, as mentioned above, controls cell movement and elasticity. An increase in fascin has already been described in many cancers, in particular in

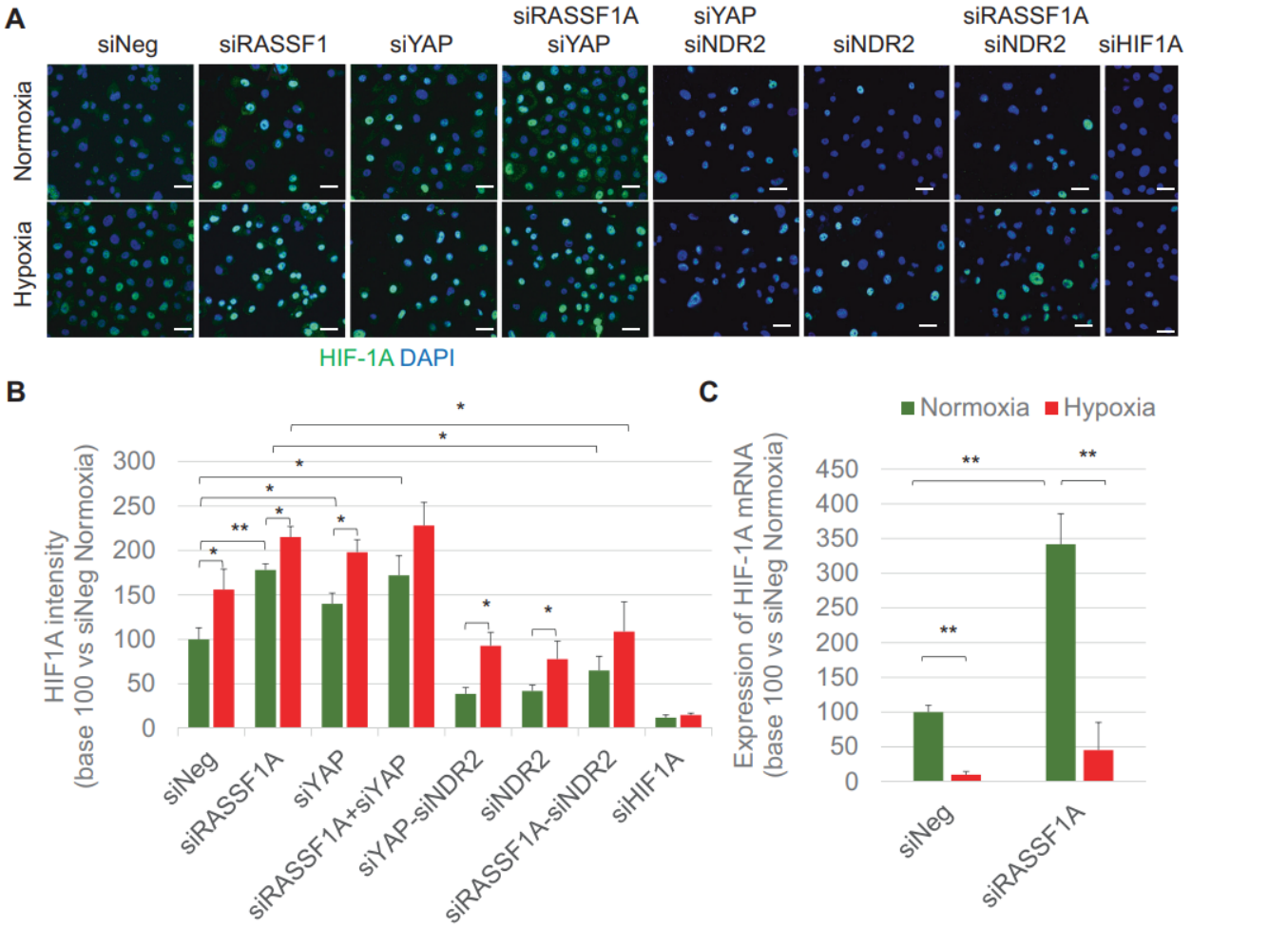



**Fig. 5 HIF-1A is activated by loss of RASSF1A and/or YAP expression in HBEC-3 cells cultured in hypoxia (0.2% $O_2$, 48 h).** Illustrations (**A**) and quantification (**B**) of HIF-1A on HBEC-3 expressing or not RASSF1A, YAP or HIF-1A (40 µm scale). **C** Expression of HIF1A mRNA measured by qPCR in HBEC-3 after 48 h of normoxia/hypoxia. Values are means ± SEM expressed in base 100 over siNeg in Normoxia. *P*-value $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, and $***p < 0.001$.

NSCLC, where it predicts a poorer prognosis [47] because it promotes cell migration and invasion of NSCLC [48]. An increase in fascin has also already been described when cells are in hypoxia [49]. However, fascin is not a suitable therapeutic target since we observed that its inhibition by siRNA caused major cytonuclear abnormalities in HBEC (data not shown).

YAP is responsible for the increased collective migration rate induced by the RASSF1A depleted-HBEC cells cultured in normoxia [15]. We show here that, the migration velocity induced by the RASSF1A depletion is independent of YAP but could be dependent of NDR2 and HIF-1A which is stabilized by RASSF1A and/or YAP silencing in hypoxia. This result is unexpected since it was shown that RASSF1A stabilized HIF-1A in NSCLC cells [16] or that YAP stabilized HIF-1A [11]. It is therefore probable that the mechanisms allowing the stabilization of HIF-1A in the absence of RASSF1A or YAP are different, and could, for example, involve the transcription factor ETS-1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1), which governs the gene expression of HIF-1A [50] and is itself activated by JNK signaling [51], which is repressed by RASSF1A [35]. Hypoxia experiments were carried out in percentage of O2 and for a duration different than that used by Dabral et al. [16], which suggests that the mechanisms are specific to a level of hypoxia (moderate, severe, chronic).

YAP activity in hypoxia coincides with the Hippo kinases decreases in hypoxia, except the NDR2 kinase, which appears to be stabilized, consistently with YAP nuclear localization in HBEC lines and YAP target genes expression. Indeed, NDR2 leads the YAP nuclear translocation in a GTPase RhoB pathway mechanism [14]. It would then be interesting to study the Rho protein pathway within the different lines to further understand how NDR2 promotes the YAP activation in hypoxia, hypoxia being also involved in cancer cell migration via the RhoA pathway [52].

We subsequently studied the expression of NDR2 and YAP on samples from patients with NSCLC. We show that NDR2 kinase expression is higher in metastatic than in localized NSCLC suggesting a link between the metastatic process and NDR2 expression. In addition, YAP is more frequently expressed higher in metastatic than in localized NSCLC. These observations highlight its potential role in the development of metastases, by inducing the expression of pro-metastatic target genes as has already been shown in breast cancer and melanoma cells [53]. The results also show that the expression of YAP at the nuclear level is higher in higher in metastatic than in localized NSCLC, which again suggests that the metastases take place in a YAP-dependent manner although this remains to be proven in an in-vivo study by carrying out an extinction of the expression of YAP or else by preventing its nuclear translocation.

Regarding the expression of YAP, the results did not reveal a significant difference in expression between the metastatic or non-metastatic NSCLC. Such comparison was not previously done

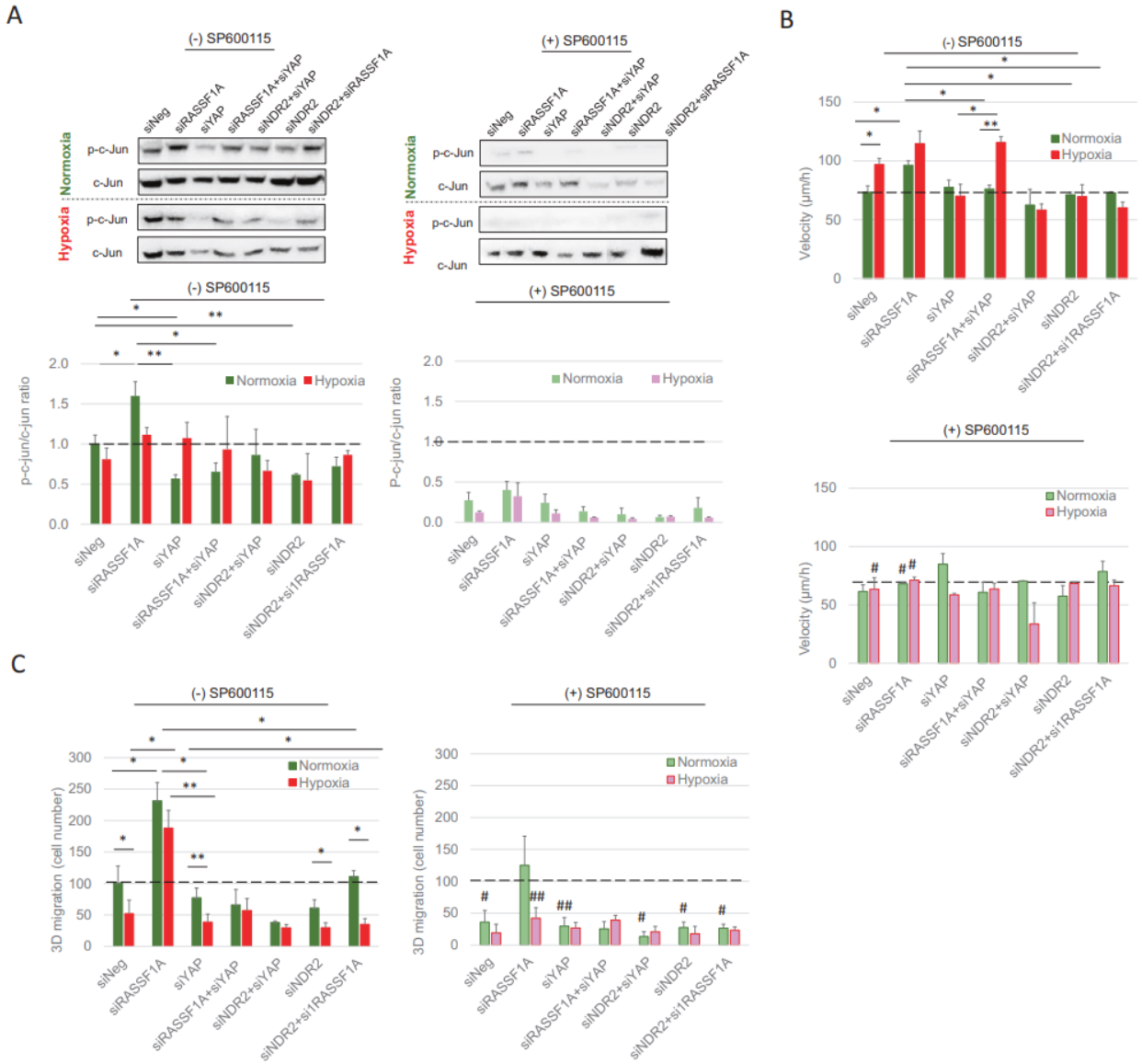



**Fig. 6 Hypoxia exacerbates the ability of HBEC cells with overactive NDR2 to migrate in a YAP and c-Jun-dependent mechanism.** **A** Expression of c-Jun and phospho-c-Jun (p-c-Jun) proteins evaluated by western blot in HBEC-3 cells transfected with siNeg, siRASSF1A, siYAP, siNDR2, or both and cultivated for 48 h in normoxia or hypoxia (0.2% $O_2$). Upper panels are representative experiments and lower panel is densitometric analysis of p-c-Jun/c-Jun ratio expressed in base 1 using siNeg in normoxia condition without SP600125. **B** Cells velocity and 3D migration (**C**) of HBEC-3 cells transfected with siNeg, siRASSF1A, siYAP, siNDR2 or both and cultivated for 48 h in normoxia or hypoxia (0.2% $O_2$). The values are the mean ± SEM of three independent determinations. ANOVA was followed by a post-hoc Dunnett test, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ or $\#p < 0.05$, $\#\#p$ <using *t*-test by comparing (−) SP600125 vs (+) SP600125 in the same culture conditions.

by others to our knowledge but does not call into question the role of YAP in the formation of carcinoma metastases, in particular from lung, since independently of the quantity of YAP, the important thing is its activation.

We finally used a model of lung cancer-derived BM and show that silencing NDR2 kinase (but not NDR1) reduces the number of metastases and the overall volume and rate of lesion progression. Collectively, these results are therefore in favor of an effect of metastatic promotion of NDR2 and consistent with the role of the kinase NDR2 involved in the control of cell movement via the regulation of YAP demonstrating a pro-metastatic effect of the latter [15].

In conclusion, our results demonstrate that hypoxia is an aggravating factor in bronchial carcinogenesis by silencing the RASSF1A/Hippo pathway (except NDR2) in HBEC lines. These new data improve our understanding of the relationship between the tumor microenvironment, the Hippo signaling pathway, and the adaptation of bronchial tumor cells. Our results shed light on HIF1 as a potential therapeutic target in patients with NSCLC with inactivation of the RASSF1A gene, but also YAP. Thus, the pharmacological targeting of these new targets could be effective in preventing the spread of cancer and in improving the vital prognosis of patients with NSCLC. Our results also indicated that NDR2 kinase is over-active in NSCLC in part by hypoxia and supports BM formation (Fig. 9). NDR2 expression is thus a useful biomarker to predict the metastases risk in patients with NSCLC, easily measurable routinely by immunohistochemistry on tumor specimens.

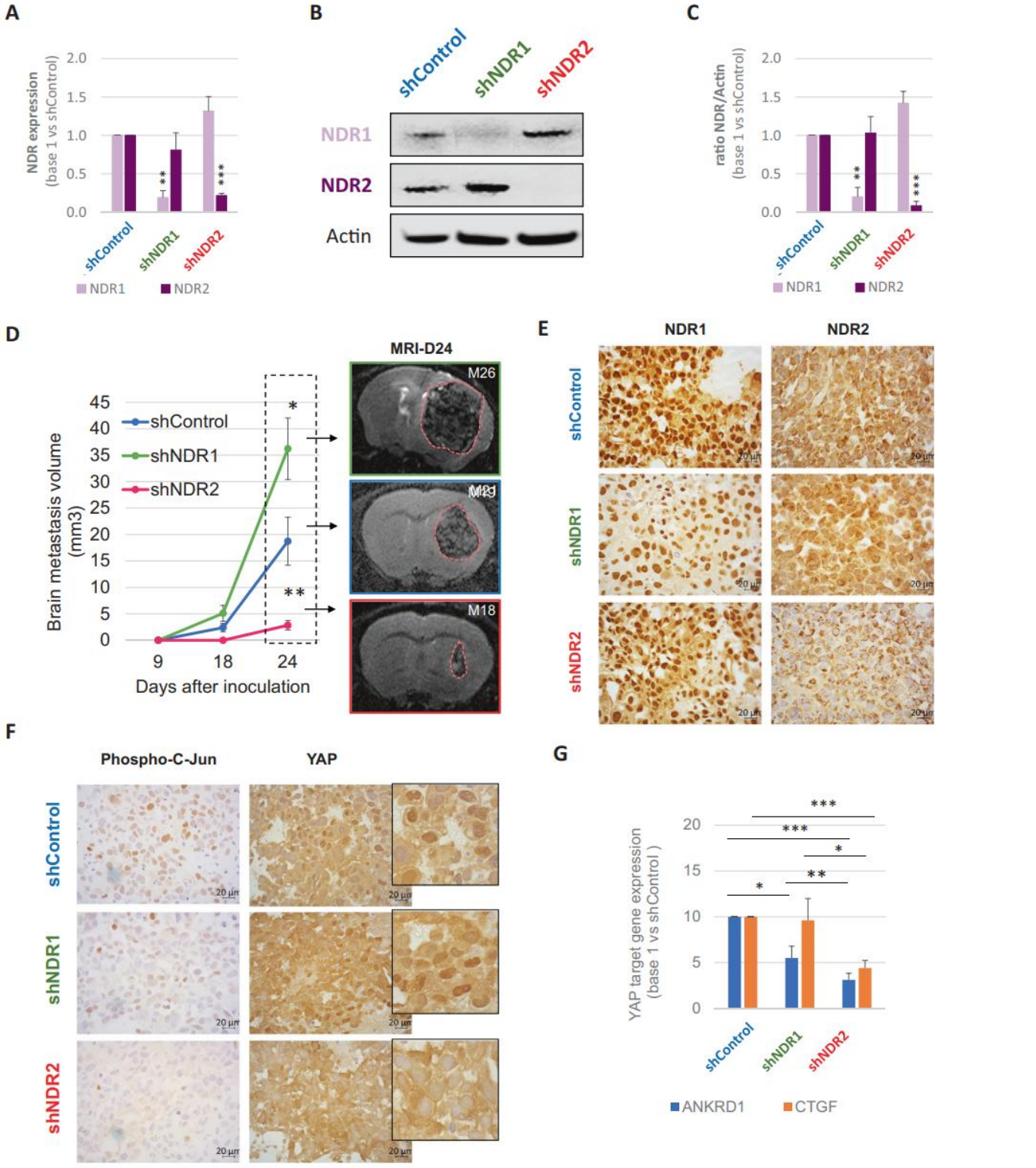



**Fig. 7 NDR2 silencing reduces development of brain metastases in Swiss Nude. A–C** Silencing of NDR1 (shNDR1), NDR2 (shNDR2) or control (shControl) was confirmed by RTqPCR (**A**) and western blot (**B**, **C**) in H2030-BrM3. Mean ± SEM, $n = 3$, $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$ vs respective control. **D** Quantitative analyzes of tumor volume at 9, 18 and 24 days after cell inoculation in the left caudate putamen (striatum) from Swiss Nude ($n = 10$ animals per condition) using MRI. Mean ± SEM, $n = 10$ $^{*}p < 0.05$ and $^{**}p < 0.01$ vs Control group. Left panel show a representative T2w-MRI images of the lesions at D24 in the three different experimental groups. **E–G** Representative immunohistochemically analysis of NDR1 and NDR2 (**E**) or phospho-c-Jun and YAP (**F**) staining in brain metastases from the three experimental groups. **G** mRNA expression of YAP targets genes ANKRD1 and CTGF in H2030-BrM3 silenced for NDR1 (shNDR1), NDR2 (shNDR2) or control (shControl). Mean ± SEM, $n = 3$ $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$ vs respective control.

**Table 1.** NDR2 silencing decreases formation and growth rate of BM from HBEC.

| | H2030-BrM3 | | | A549 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | shControl | shNDR1 | shNDR2 | shControl | shNDR2 |
| Animals with BM *n* (%) | 7/10 (70%) | 7/10 (70%) | 6/10 (60%) | 8/10 (80%) | 5/9 (55.5%) |
| BM location | | | | | |
| Striatum | 7/7 (100%) | 7/7 (100%) | 6/7 (85.7%) | 8/8 (100%) | 0 |
| Cortex | 0 | 2/7 (28.6%) | 0 | 1/8 (12.5%) | 5/5 (100%) |
| Start growing (day after inoculation) | 19.71 ± 1.11 | 18.00 ± 0.00 | 24.00 ± 0.00* | 33.0 ± 6.3 | 40.6 ± 5.5* |
| Growth rate ($mm^3$/day) | 18.73 ± 4.53 | 36.22 ± 5.81* | 2.84 ± 0.90**, ### | 7.27 ± 1.57 | 0.33 ± 0.13** |

*t*-test : * vs shControl ; # vs shNDR1.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

We selected a retrospective population of 45 patients operated on a non-metastatic NSCLC ($n = 25$) or metastatic NSCLC ($n = 20$) for whom both the primitive tumor and the brain metastasis (BM) were available, at Caen University Hospital between December 2009 and December 2019. Among the 25 patients with localized NSCLC, 17 were men and 8 were women with an average age of 71 years [54 – 86 years]. Among the 20 patients with metastatic NSCLC, 15 were men and 5 were women with an average age of 67 years [40–82 years]. As required by French laws, all patients provided informed consent, and the study was approved by the institutional ethics committee (North-West-Committee-for-Persons-Protection-III N°DC-2008-588).

### Mice brain metastasis model

All animal investigations were performed under the current European directive (2010/63/EU) following ARRIVE guidelines, in the housing and laboratories #F14118001/#G14118001 and with the permission of the regional committee on animal ethics (C2EA-54 CENOMEXA, project #23280). Nude athymic mice (20-25 g, 8 weeks, male) were maintained in specific pathogen-free housing. Mice were manipulated under general anesthesia (5% isoflurane for induction, 2% for maintenance in a 1 l/min of 70%$N_2O$/30%$O_2$). Body temperature was monitored and maintained at 37.5 ± 0.5 °C throughout the experiments. Mice were placed in a stereotaxic head holder and a scalp incision was performed along the sagittal suture. H2030-BrM3 cells ($10^5$ cells in 3-µl-PBS supplemented by glutamine (2 mM)) were injected over 5 min (0.6 µl/min) via a fine needle (30 G) connected to a Hamilton syringe. The injection sites were the right caudate putamen at a depth of 4 mm and lateralization on the right of 2.5 mm. Mice were randomly selected, and injected with H2030-BrM3 cells (shControl, shNDR1 or shNDR2). Animals were followed twice a week by anatomical MRI over a 21 days' period to follow BM development. The endpoints of the protocol to limit pain of animals are described in the project authorization number#23280 (C2EA-54 CENOMEXA). The number of animals ($n = 10$/lot) was calculated to be as low as possible while allowing robust measurements (the distribution is Gaussian and parametric tests are applicable).

### Acquisition of magnetic resonance imaging and sequence analysis

The development of the lesions was monitored twice a week using magnetic resonance imaging (MRI) on a 7 Tesla magnet (Pharmascan, Bruker, Ettlingen, Germany). All experiments were performed under isoflurane anesthesia: 5% and during induction and 2.5% during the procedure in a 1 L/min mixture N20 and 02 (70 and 30%). The mouse is placed in a cradle allowing the head to be held by ear and tooth bars. Breathing is monitored in real time using a pressure balloon under the abdomen.

Fast imaging, FLASH sequence (Fast Low Angle Shot); TR/TEeff: 100/4 msec; resolution 0.39 × 0.39 × 3 $mm^3$, acquisition time = 12 s), was out to verify the positioning of the animal and allow acquisition adjustments. T2-weighted imaging by rapid spin echo or RARE8 (Rapid Acquisition Relaxation Enhanced 8) sequence was then acquired with the following parameters: TR/TEeff = 5000/65 ms, number of repetitions = 1, spatial resolution = 0.078 × 0.078, 26 slices 0.5 mm, acquisition time = 2 min.

Tumor delineation was performed using ImageJ software (NIH, Wayne Rasband, Maryland, USA) on all adjacent T2w slices and tumor volume was achieved by multiplication of the sum of contiguous tumor surface areas with the slice thickness.

To note, the acquisition of MRI and sequence analysis were performed without knowing the group the animals belonged to (shControl, shNDR1 or shNDR2).

### Cell culture transfection and treatment

Immortalized human bronchial epithelial HBEC-3 cells, provided by Dr. Michael White (UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX, USA), were grown as previously described [15]. BEAS-2B, A549, H1299, H1915 (from the American Type Culture Collection), and H2030-BrM3 ($KRAS^{G12C}$ mutated from MSKCC, Dr Joan Massagué) were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal bovine serum. Mediums were complemented by 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2mM l-glutamine (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), and cells incubated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% $CO_2$. Cells were routinely tested for mycoplasma contamination using MycoAlert® Mycoplasma Detection Kits (Lonza, Colmar, France), and recently authenticated by STR profiling (Microsynth AG, Switzerland).

RNAi oligonucleotides (Eurogentec®) sequences are in Table S1. Non-silencing negative control was from Dharmacon (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Plasmids are described [15]. The transfection was performed using Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions at 30% (siRNA) and 70% (plasmids) of cell confluence.

For 0.2% oxygen culture, the cells were kept in a hypoxia workstation (INVIVO2, Ruskinn, ABE, Guipry, France) with an atmosphere humidified with 0.2% $O_2$, 95% nitrogen and 5% $CO_2$ at 37 °C.

For the c-jun pharmacological inhibition, the cells were treated with SP600125 (1 µM) (Selleckchem, Houton, TX, USA).

### Preparation of RNA and RT-PCR

The extraction of total RNA from cells was carried out using the illustra RNAspin mini® column (GE Healthcare, Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA), according to the manufacturer's instructions. Total RNA (250 ng) was reverse-transcribed with random primers and 200 IU M-MLV reverse transcriptase (37 °C, 90 min), followed by dissociation (70 °C, 5 min) with Mastercycler Eppendorf®. The resulting cDNAs were diluted (1/10) and used as templates. Polymerase chain reaction (PCR) was performed in a Mx3005P QPCR system (Agilent Technology, Les Ulis, France) with 5 pmol of each primer set (Table S2) and iQTM SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). S16 was used as an internal control. Positive standards and reaction mixtures lacking the reverse transcriptase were employed routinely as controls for each RNA sample. Relative quantification was calculated using the ΔΔCt method.

### Preparation of DNA and methylation-specific PCR assay

DNA samples were obtained from cells using the QIAamp DNA Tissue kit (Qiagen, Les Ulis, France). Genomic DNA bisulfite modification was performed using the Epitect kit (Qiagen, Les Ulis, France), according the manufacturer's instructions and previously described [54]. PCR was

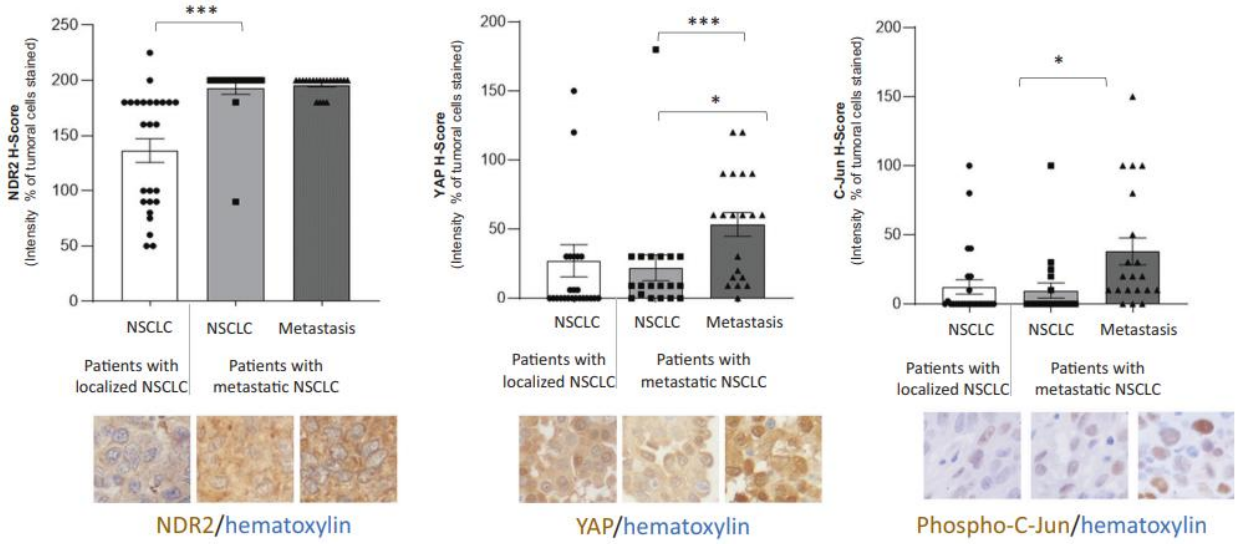



**Fig. 8 NDR2 expression increases in primitive NSCLC leading to brain metastasis.** We immunostained a retrospective population of 45 patients operated on a non-metastatic NSCLC ($n = 25$) or metastatic NSCLC ($n = 20$) for whom both the primitive tumor and the brain metastasis (BM) were available, with NDR2 (1:400), YAP (1:400) or phospho-c-Jun (1:50). Data are the mean ± SEM of a IHC score calculated as the sum of the staining intensity (0–3) multiplied by the distribution (0–100%) (*$p < 0.05$, ***$p < 0.001$).

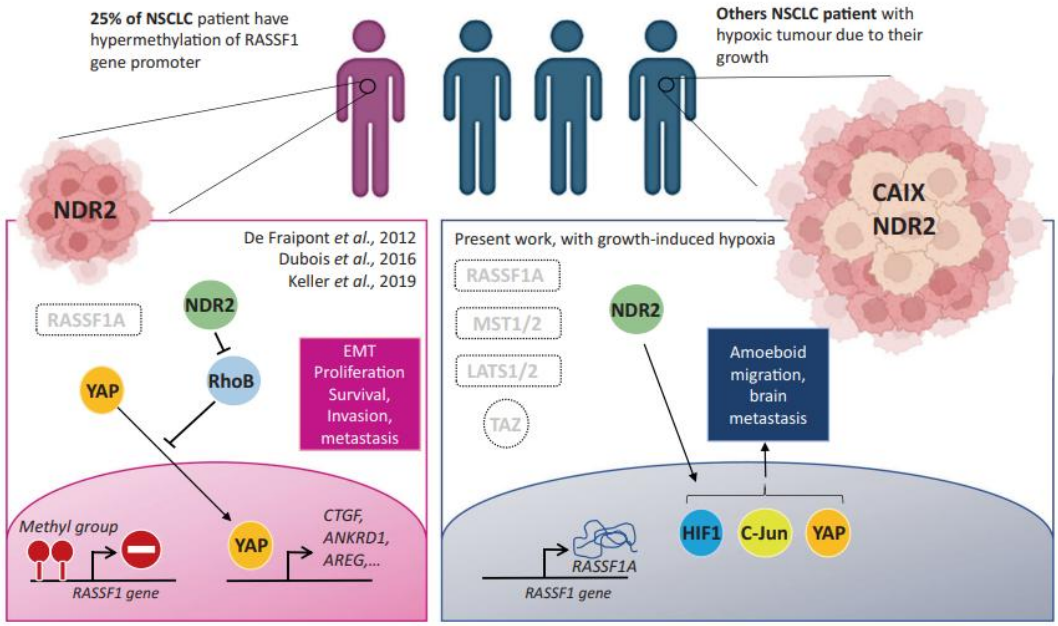



**Fig. 9 NDR2 underlies brain metastases from Non-Small Cell Lung Cancer.** Hypoxia-induced activation of NDR2 underlies brain metastases from Non-Small Cell Lung Cancer (Graphical abstract).

conducted with specific primers for either the methylated or unmethylated alleles (Table S3) in standard conditions.

### Antibodies, immunofluorescence, immunohistochemistry, immunoblotting, and image analysis

The antibodies are in Table S4.

For immunofluorescence, cells were seeded at a density of $2 \times 10^4$ per 24-well, then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 4% paraformaldehyde (20 min, 37 °C). The cells were permeabilized with frozen methanol for 10 min and blocked with 4% bovine serum albumin for 1 h and stained with primary antibodies at 4 °C overnight. After wash with PBS, cells were stained with Alexa-488- or Alexa-555-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR, USA) (1 h, room temperature (RT)) and with DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole) (SantaCruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Digital pictures were captured using a high-throughput confocal microscopy (FluoView FV1000, Olympus).

For immunohistochemistry, tumor paraffin-embedded blocks were processed [55] with primary antibody diluted at 1:200. An overall IHC composite score was calculated (staining intensity (0–3, 0: negative, 1: weak, 2: moderate, and 3: strong) multiplied by the distribution (0–100%) from all parts of the slide).

For immunoblotting, whole-cell protein extracts were prepared [15], and proteins were detected by immunoblotting with the primary antibody diluted to 1:1 000 in Tween (0.1%)-TBS buffer and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody, then revealed by enhanced chemiluminescence using the ECL kit (Promega™, Charbonnières-les-Bains,

France). Densitometry results of western blot were analyzed with Image J software.

### BrdU incorporation assay

BrdU incorporation assay kit (Millipore, Billerica, MA, USA) was used in accordance with the manufacturer's instructions. Spectrophotometric detection was performed at 450 nm wavelength.

### Caspase-3/7 assay

Caspase-3/7 activation was assayed using the Caspase-Glo 3/7 Luminescence Assay (Promega Corp., Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

### Wound-healing assay

Transfected cells were grown in complete medium onto 24-well Collagen IV coated plates (BD Biocoat™, Heidelberg, Germany). They were pretreated with mitomycin C at non-cytotoxic concentrations (1 ug/ml) for 12 h before an artificial "wound" carefully created at 0 h, using a P-20 pipette tip. Photographs were taken (X10) at 0 h and 6 h. The average velocity of cell migration was measured by subtracting distances across the wound at 0 h and 6 h and expressed as µm/h.

### 3D migration assay

In all, $25 \times 10^3$ cells in 250 µl serum-free medium were added to the top chambers of 24-well Transwell plates containing a cell culture inserted with 8 µm pore size (Greiner Bio-One, Courtaboeuf, France). The lower chamber was filled with 700 µl complete media. After 48 h of incubation, the non-migrating cells (on the top) were removed and the migrating cells (on filter's lower surface) were stained using crystal violet then counted under an inverted microscope at x20 magnification.

### Statistical analysis

Data are means ± SEM of three independent experiments. The data were analyzed using a two-tailed Student's t-test (single comparison) or one-way ANOVA followed by Dunnett's (multiple comparison analysis, GraphPad Prism 4, a GraphPad Software program (San Diego, CA, USA), the variance was similar between the groups that are being statistically compared). Differences are significant at $p < 0.05$.

## DATA AVAILABILITY

All data are stored at the GIP Cyceron and Université de Caen Normandie (Caen, France), and can be made available upon request.

## REFERENCES

1. Chen Q, Liu G, Liu S, Su H, Wang Y, Li J, et al. Remodeling the tumour microenvironment with emerging nanotherapeutics. Trends Pharmacol Sci. 2018;39:59–74.
2. Salem A, Asselin MC, Reymen B, Jackson A, Lambin P, West CML, et al. Targeting hypoxia to improve non-small cell lung cancer outcome. J Natl Cancer Inst. 2018;110:14–30.
3. Ziółkowska-Suchanek I. Mimicking tumour hypoxia in non-small cell lung cancer employing three-dimensional in vitro models. Cell. 2021;10:141–64.
4. Palakurthy RK, Wajapeyee N, Santra MK, Gazin C, Lin L, Gobeil S, et al. Epigenetic silencing of the RASSF1A tumour suppressor gene through HOXB3-mediated induction of DNMT3B expression. Mol Cell. 2009;36:219–30.
5. Yan L, Cai Q, Xu Y. Hypoxic conditions differentially regulate TAZ and YAP in cancer cells. Arch Biochem Biophys. 2014;562:31–36.
6. Ma B, Chen Y, Chen L, Cheng H, Mu C, Li J, et al. Hypoxia regulates hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. Nat Cell Biol. 2015;17:95–103.
7. Ma B, Cheng H, Gao R, Mu C, Chen L, Wu S, et al. Zyxin-Siah2-Lats2 axis mediates cooperation between hippo and TGF-β signalling pathways. Nat Commun. 2016;7:11123–36.
8. Thienpont B, Steinbacher J, Zhao H, D'Anna F, Kuchnio A, Ploumakis A, et al. Tumour hypoxia causes DNA hypermethylation by reducing TET activity. Nature. 2016;537:63–68.
9. Wei H, Xu Z, Liuv F, Wang F, Wang X, Sun X, et al. Hypoxia induces oncogene yes-associated protein 1 nuclear translocation to promote pancreatic ductal adenocarcinoma invasion via epithelial–mesenchymal transition. Tumour Biol. 2017;39:1010428317691684.
10. Zhao C, Zeng C, Ye S, Dai X, He Q, Yang B, et al. Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with a PDZ-binding motif (TAZ): a nexus between hypoxia and cancer. Acta Pharm Sin B. 2020;10:947–60.
11. Zhang X, Li Y, Ma Y, Yang L, Wang T, Meng X, et al. Yes-associated protein (YAP) binds to HIF-1α and sustains HIF-1α protein stability to promote hepatocellular carcinoma cell glycolysis under hypoxic stress. J Exp Clin Cancer Res. 2018;37:216–28.
12. Ma X, Zhang H, Xue X, Shah YM. Hypoxia-inducible factor 2α (HIF-2α) promotes colon cancer growth by potentiating yes-associated protein 1 (YAP1) activity. J Biol Chem. 2017;292:17046–56.
13. de Fraipont F, Levallet G, Creveuil C, Bergot E, Beau-Faller M, Mounawar M, et al. An apoptosis methylation prognostic signature for early lung cancer in the IFCT-0002 trial. Clin Cancer Res. 2012;18:2976–86.
14. Keller M, Dubois F, Teulier S, Martin APJ, Levallet J, Maille E, et al. NDR2 kinase contributes to cell invasion and cytokinesis defects induced by the inactivation of RASSF1A tumor-suppressor gene in lung cancer cells. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38:158–74.
15. Dubois F, Keller M, Calvayrac O, Soncin F, Hoa L, Hergovich A, et al. RASSF1A suppresses the invasion and metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells by inhibiting YAP activation through the GEF-H1/RhoB pathway ». Cancer Res. 2016;76:1627–40.
16. Dabral S, Muecke C, Valasarajan C, Schmoranzer M, Wietelmann A, Semenza GL, et al. A RASSF1A-HIF1α loop drives Warburg effect in cancer and pulmonary hypertension. Nat Commun. 2019;10:2130–48.
17. Le QT, Chen E, Salim A, Cao H, Kong CS, Whyte R, et al. An evaluation of tumour oxygenation and gene expression in patients with early stage non small cell lung cancers. Clin Cancer Res. 2006;12:1507–14.
18. McKeown SR. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours-implications for treatment response. Br J Radiol. 2014;87:20130676.
19. Carreau A, El Hafny-Rahbiv B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. J Cell Mol Med. 2011;15:1239–53.
20. Corroyer-Dulmont A, Valable S, Fantin J, Chatre L, Toutain J, Teulier S, et al. Multimodal evaluation of hypoxia in brain metastases of lung cancer and interest of hypoxia image-guided radiotherapy. Sci Rep. 2021;11:11239.
21. Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. Genes Dev. 2016;30:1–17.
22. Jiménez AP, Traum A, Boettger T, Hackstein H, Richter AM, Dammann RH. The tumour suppressor RASSF1A induces the YAP1 target gene ANKRD1 that is epigenetically inactivated in human cancers and inhibits tumour growth. Oncotarget. 2017;8:88437–52.
23. Ashaie MA, Chowdhury EH. Cadherins: the superfamily critically involved in breast cancer. Curr Pharm Des. 2016;22:616–38.
24. Kotini M, Barriga EH, Leslie J, Gentzel M, Rauschenberger V, Schambony A, et al. Gap Junction protein connexin-43 is a direct transcriptional regulator of N-cadherin in vivo. Nat Commun. 2018;9:4633.
25. Tanaka M, Fujii Y, Hirano K, Higaki T, Nagasaki A, Ishikawa R, et al. Fascin in lamellipodia contributes to cell elasticity by controlling the orientation of filamentous actin. Genes Cells. 2019;24:202–13.
26. Lintz M, Muñoz A, Reinhart-King CA. The mechanics of single cell and collective migration of tumour cells. J Biomech Eng. 2017;139:0210051–9.
27. Tátrai E, Bartal A, Gacs A, Paku S, Kenessey I, Garay T, et al. Cell type-dependent HIF1 α-mediated effects of hypoxia on proliferation, migration and metastatic potential of human tumour cells. Oncotarget. 2017;8:44498–510.
28. Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible expression of tumour-associated carbonic anhydrases. Cancer Res. 2000;60:7075–83.
29. Grose R. Epithelial migration: open your eyes to c-Jun. Curr Biol. 2003;13:R678–R680.
30. Wang PY, Wang SR, Xiao L, Chen J, Wang JY, Rao JN, et al. c-Jun enhances intestinal epithelial restitution after wounding by increasing phospholipase C-γ1 transcription. Am J Physiol Cell Physiol. 2017;312:C367–C375.
31. Lin G, Yu B, Liang Z, Li L, Qu S, Chen K, et al. Silencing of c-jun decreases cell migration, invasion, and EMT in radioresistant human nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2R. Onco Targets Ther. 2018;11:3805–15.
32. Alfranca A, Gutiérrez MD, Vara A, Aragonés J, Vidal F, Landázuri MO. c-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. Mol Cell Biol. 2002;22:12–22.
33. Yu B, Miao ZH, Jiang Y, Li MH, Yang N, Li T, et al. c-Jun protects hypoxia-inducible factor-1alpha from degradation via its oxygen-dependent degradation domain in a nontranscriptional manner. Cancer Res. 2009;69:7704–12.
34. Laderoute KR, Calaoagan JM, Gustafson-Brown C, Knapp AM, Li GC, Mendonca HL, et al. The response of c-jun/AP-1 to chronic hypoxia is hypoxia-inducible factor 1 alpha dependent. Mol Cell Biol. 2002;22:2515–23.
35. Whang YM, Kim YH, Kim J, Yoo YD. RASSF1A suppresses the c-Jun-NH2-kinase pathway and inhibits cell cycle progression. Cancer Res. 2005;65:3682–90.

36. Ren W, Mi D, Yang K, Cao N, Tian J, Li Z, et al. The expression of hypoxia-inducible factor-1α and its clinical significance in lung cancer: a systematic review and meta-analysis. Swiss Med Wkly. 2013;143:w13855.
37. Yang SL, Ren QG, Wen L, Hu JL. Clinicopathological and prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci. 2016;36:321–7.
38. Gao ZJ, Wang Y, Yuan W, Yuan JQ, Yuan K. HIF-2α not HIF-1α overexpression confers poor prognosis in non-small cell lung cancer. Tumour Biol. 2017;39:1010428317709637.
39. Zheng H, Ning Y, Zhan Y, Liu S, Yang Y, Wen Q, et al. Co-expression of PD-L1 and HIF-1α predicts poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer after surgery. J Cancer. 2021;12:2065–72.
40. Ancel J, Perotin JM, Dewolf M, Launois C, Mulette P, Nawrocki-Raby B, et al. Hypoxia in lung cancer management: a translational approach. Cancers. 2021;13:3421.
41. Polosukhin VV, Cates JM, Lawson WE, Milstone AP, Matafonov AG, Massion PP, et al. Hypoxia-inducible factor-1 signalling promotes goblet cell hyperplasia in airway epithelium. J Pathol. 2011;224:203–11.
42. Mello SS, Valente LJ, Raj N, Seoane JA, Flowers BM, McClendon J, et al. A p53 super-tumor suppressor reveals a tumor suppressive p53-Ptpn14-Yap axis in pancreatic cancer. Cancer Cell. 2017;32:460–73.
43. Greenhough A, Bagley C, Heesom KJ, Gurevich DB, Gay D, Bond M, et al. Cancer cell adaptation to hypoxia involves a HIF-GPRC5A-YAP axis. EMBO Mol Med. 2018;10:e8699.
44. Nguyen TH, Kugler JM. Ubiquitin-dependent regulation of the mammalian hippo pathway: therapeutic implications for cancer. Cancers. 2018;10:121.
45. Liang Z, Wang Y, Shen Z, Teng X, Li X, Li C, et al. Fascin 1 promoted the growth and migration of non-small cell lung cancer cells by activating YAP/TEAD signaling. Tumour Biol. 2016;37:10909–15.
46. Lehmann S, Te Boekhorst V, Odenthal J, Bianchi R, van Helvert S, Ikenberg K, et al. Hypoxia induces a HIF-1-dependent transition from collective-to-amoeboid dissemination in epithelial cancer cells. Curr Biol. 2017;27:392–400.
47. Zhang Y, Liang B, Dong H. Expression of Fascin_1 protein in cancer tissues of patients with nonsmall cell lung cancer and its relevance to patients' clinicopathologic features and prognosis. J Cancer Res Ther. 2018;14:856–9.
48. Zhao D, Zhang T, Hou XM, Ling XL. Knockdown of fascin-1 expression suppresses cell migration and invasion of non-small cell lung cancer by regulating the MAPK pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2018;497:694–9.
49. Zhao X, Gao S, Ren H, Sun W, Zhang H, Sun J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis by activating transcription of the actin-bundling protein fascin. Cancer Res. 2014;74:2455–64.
50. Salnikow K, Aprelikova O, Ivanov S, Tackett S, Kaczmarek M, Karaczyn A, et al. Regulation of hypoxia-inducible genes by ETS1 transcription factor. Carcinogenesis. 2008;29:1493–509.
51. Zhang W, Zhao J, Lee JF, Gartung A, Jawadi H, Lambiv WL, et al. ETS-1-mediated transcriptional up-regulation of CD44 is required for sphingosine-1-phosphate receptor subtype 3-stimulated chemotaxis. J Biol Chem. 2013;288:32126–37.
52. Leong HS, Chambers AF. Hypoxia promotes tumor cell motility via RhoA and ROCK1 signaling pathways. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111:887–8.
53. Lamar JM, Xiao Y, Norton E, Jiang ZG, Gerhard GM, Kooner S, et al. SRC tyrosine kinase activates the YAP/TAZ axis and thereby drives tumor growth and metastasis. J Biol Chem. 2019;294:2302–17.
54. Levallet G, Creveuil C, Bekaert L, Péres E, Planchard G, Lecot-Cotigny S, et al. Promoter hypermethylation of genes encoding for RASSF/hippo pathway members reveals specific alteration pattern in diffuse gliomas. J Mol Diagn. 2019;21:695–704.
55. Levallet G, Bergot E, Antoine M, Creveuil C, Santos AO, Beau-Faller M, et al. High TUBB3 expression, an independent prognostic marker in patients with early non-small cell lung cancer treated by preoperative chemotherapy, is regulated by K-Ras signaling pathway. Mol Cancer Ther. 2012;1:1203–13.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank the VIRTUAL'HIS platform. We also thank Dr. Joan Massagué (MSKCC, USA) for providing the H2030-Br3M cell line. Research grants were from the Ligue Contre le Cancer de Normandie for G. Levallet (2019-2020) and the AIR (Association des Insuffisants respiratoires) to G. Levallet (2018) and S. Teulier (2020). This research was also funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Université Caen-Normandie (UNICAEN).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception and design: GL, JL, and EB. Development of methodology: JL, TB, CB, MD, FD, DLF, JT, ST, JT, NE, MB, SV, and GL. Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): JL, TB, CB, MD, FD, DLF, JT, ST, JT, MB, SV, EB, and GL. Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): JL, TB, CB, MD, FD, DLF, JT, NE, ST, SV, EB, and GL. Writing, review, and/or revision of the manuscript: JL, TB, CB, MD, FD, DLF, JT, ST, JT, MB, SV, EB, and GL. Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): JL, TB, CB, MD, FD, DLF, JT, ST, SV, and GL. Study supervision: GL and EB.

## COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

## ETHICAL APPROVAL

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Institutional Ethics Committee of the Caen University Hospital center (protocol code DC-2008-588, date of approval: 12 April 2010) authorizing the collection, conservation and preparation activities for scientific purposes included in this collection of human biological samples at the Caen University Hospital center".

## INFORMED CONSENT

Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Supplementary information** The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41419-023-06345-3.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to Guénaëlle Levallet.

**Reprints and permission information** is available at http://www.nature.com/reprints

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

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2023

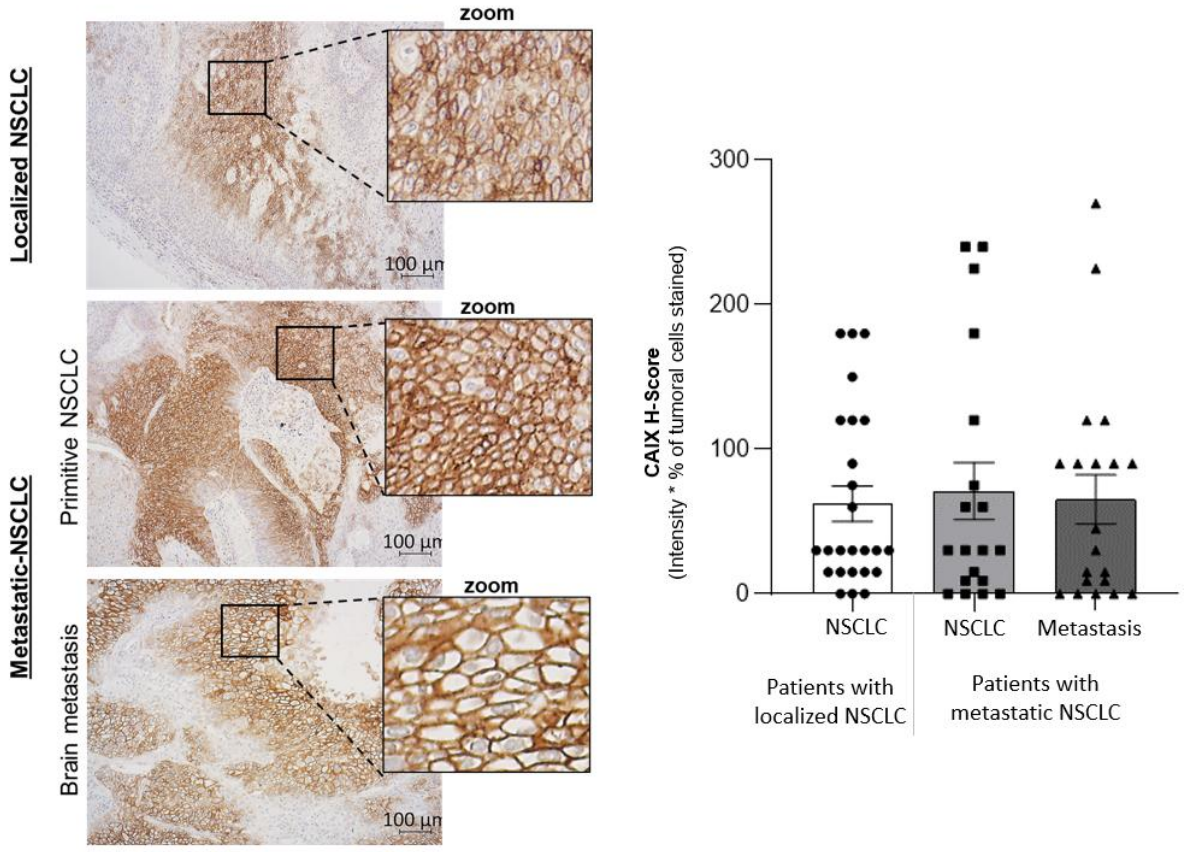



**Figure S1. NSCLC primitive tumors as their brain metastases are hypoxic tumors**.

We selected a retrospective population of 45 patients operated on a non-metastatic NSCLC (n=25) or metastatic NSCLC (n=20) for whom both the primitive tumor and the brain metastasis (BM) were available, at Caen University Hospital

After the epitopes retrieval and saturation of endogenous peroxidases, slides with tumor specimen were incubated at room temperature with rabbit polyclonal CAIX antibody (Genetex, GTX15086) diluted at 1:1000 for 60 minutes. Then, antibody fixation was revealed by the Novolink System (Leica). The staining intensities were evaluated in a blinded manner at 40x magnification and were scored using marker-specific 0–3 scales (0: negative, 1: weak, 2: moderate, and 3: strong). An overall IHC composite score was calculated based on the sum of the staining intensity (0–3) multiplied by the distribution (0%–100%) from all parts of the slide, thereby providing an H-score between 0 and 300. Data are represented as the mean ± SEM.

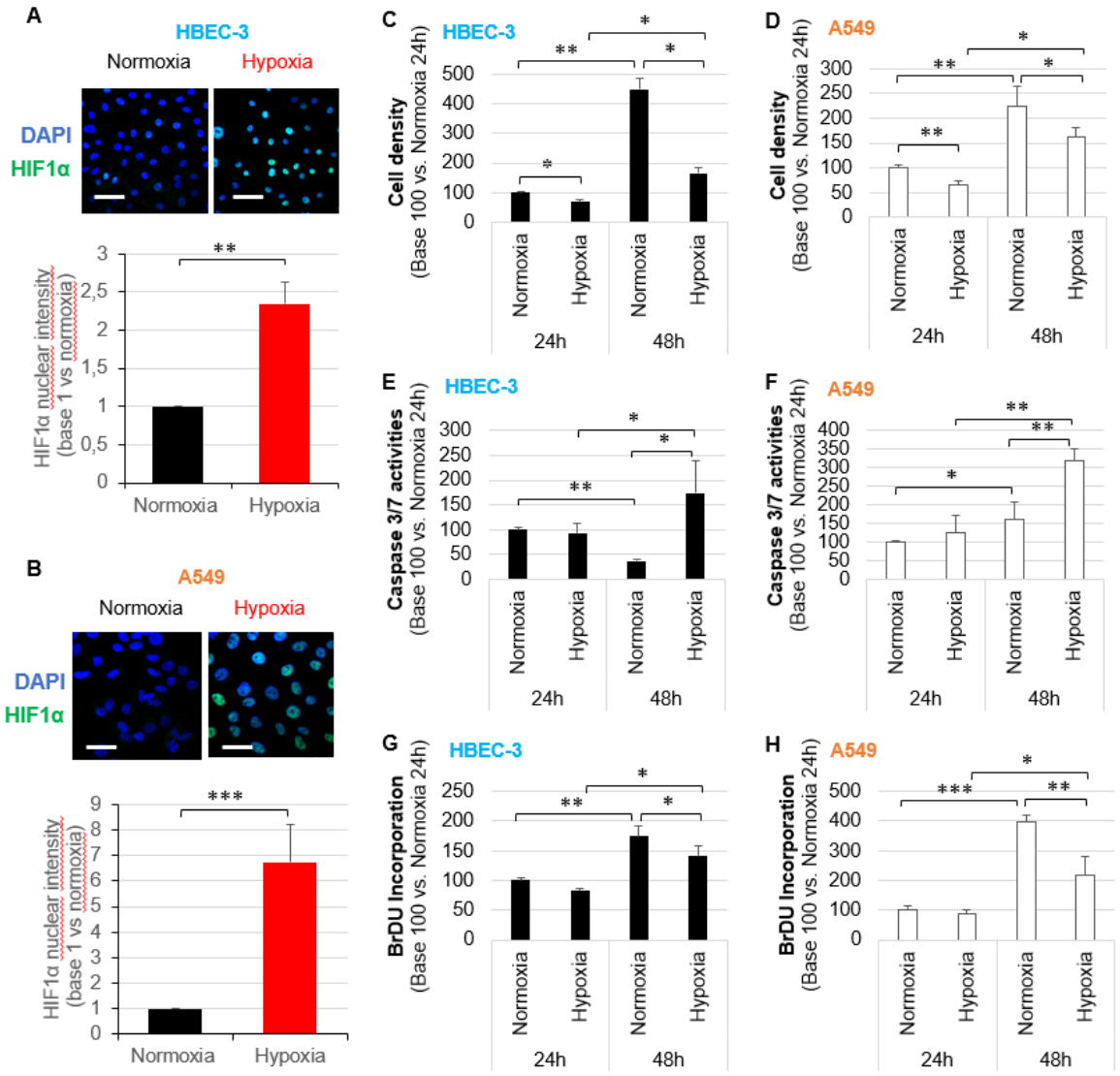



**Figure S2: The HBEC-3 and A549 cells line survive to an acute (0.2% O2) and prolonged (48h) hypoxia.**

**A-B**) Immunocytochemistry showing nuclear staining of HIF1α in HBEC-3 (**A**) and A549 cells (**B**) cultivated 48 hours in normoxia or hypoxia (0.2% O2). Lower panel representing quantification of nuclear staining. Data are means ±SEM, N=3. ***: p <0.001 using t-test. Scale bar 50 µm.

**C-D)** Cell density, evaluated by violet crystal staining, of HBEC-3 (**C**) and A549 (**D**) cultivated for 24 to 48 hours in normoxia or hypoxia (0.2% O2, in a hermetic hypoxia chamber (INVIVO2, Ruskinn).

**E-F)** Cell death, evaluated by measuring the activity of caspases 3/7, HBEC-3 (**E**) and A549 (**F**) cultivated for 24 to 48 hours in normoxia or hypoxia.

**G-H)** Cell proliferation, evaluated by measuring the incorporation of BrDU by the HBEC-3 (**G**) and A549 (**H**) of the HBEC-3 and A549 cells cultivated for 24 h to 48 h in normoxia or hypoxia.

**C-H)** The results are expressed in base 100 ±SEM, the value 100 being assigned to the quantity measured for the control cells (cells in normoxia at 24 h of culture). ANOVA followed by a post-hoc Dunnett test, *: p <0.05, **: p <0.01 and ***: p <0.001 (n≥3).

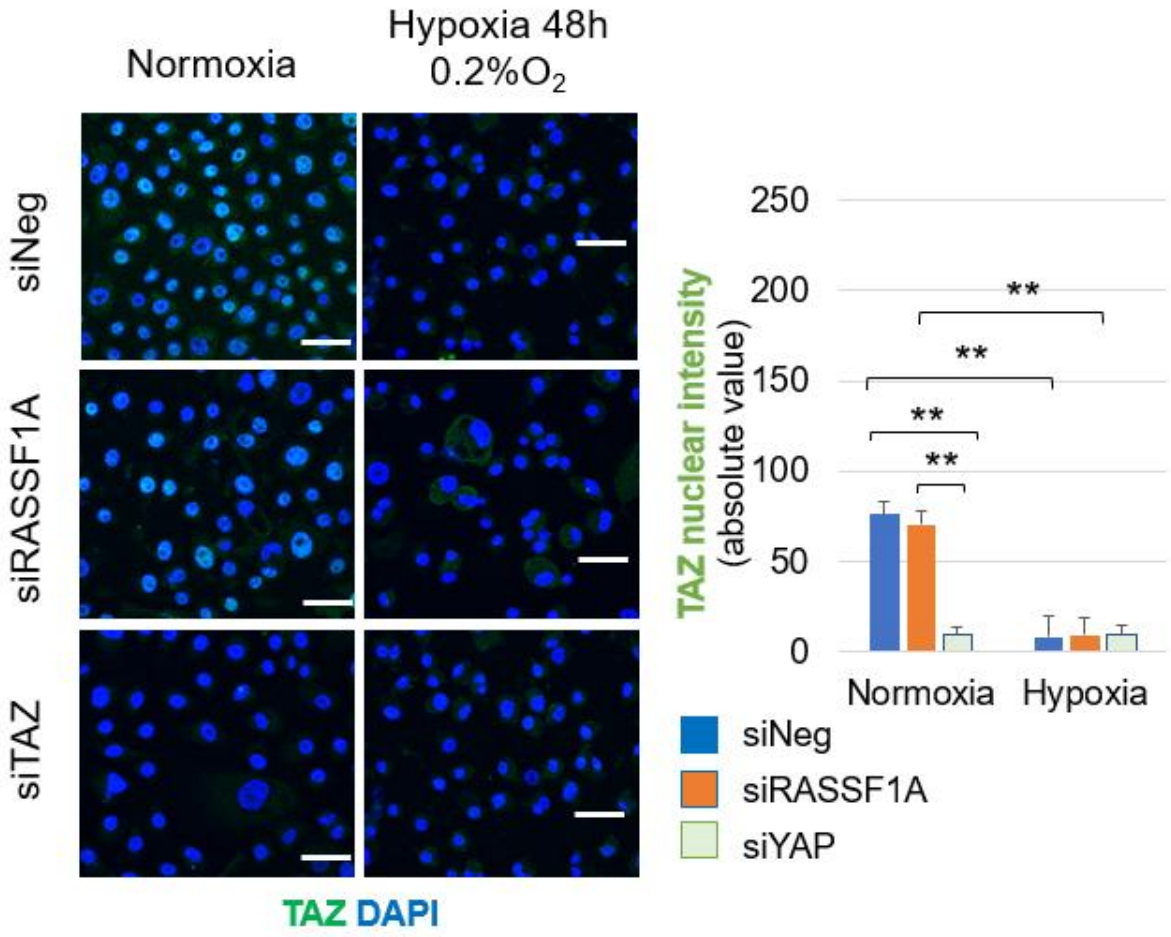



**Figure S3: Severe and prolonged hypoxia (0.2% $0_2$, 48h) downregulates TAZ in HBEC-3 cells.** Immunostaining of TAZ on HBEC-3 expressing or not RASSF1A and TAZ, after 48h of normoxia/hypoxia and Graphic representation of TAZ nuclear intenstity. P-value ** P <0.01 (SEM n≥3)

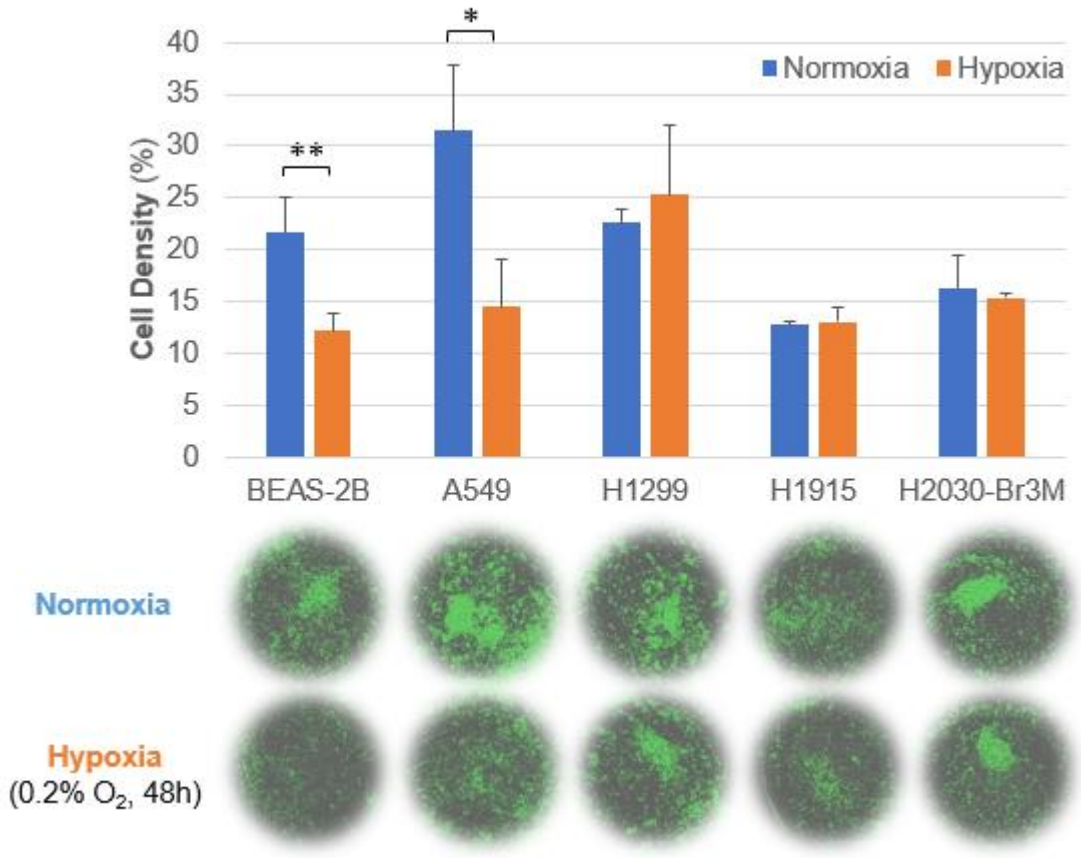



**Figure S4: The BEAS-2B, A549, H1299, H1915 as H2030-Br3M cells lines survive to an acute (0.2% O2) and prolonged (48h) hypoxia.**

Cells were grown up to 30% confluence then for additional 48h in normoxia or hypoxia (0.2% $O_2$, in a hermetic hypoxia chamber (INVIVO2, Ruskinn).

Cell density of BEAS-2B, A549, H1299, H1915 as H2030-Br3M was evaluated with the plate reader Spark (Tecan®), representative capture of wells is shown under each histogram. The results are expressed in percent of the area occupied by cells. ANOVA followed by a post-hoc Dunnett test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ and ***: $p < 0.001$ (n=3).

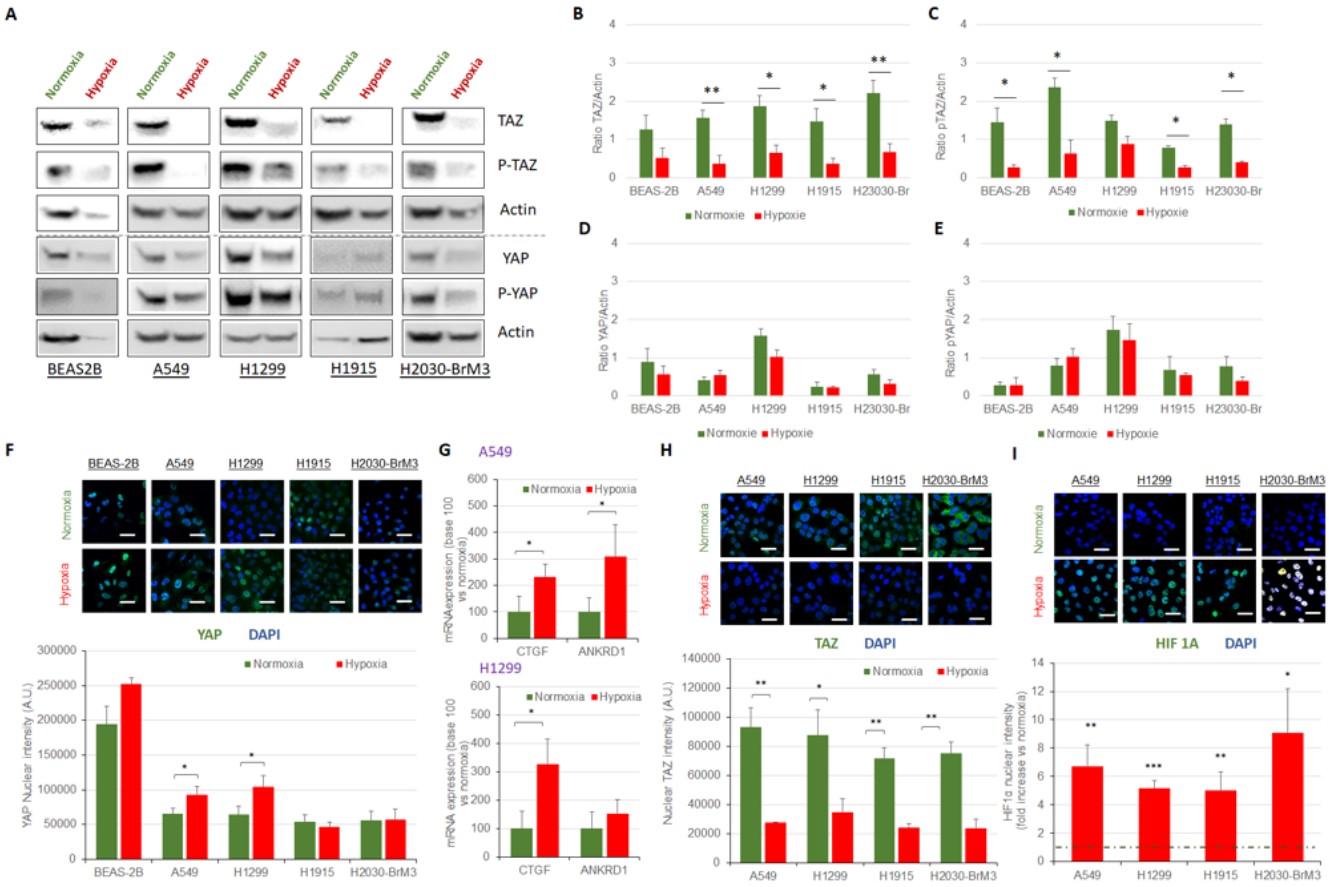



**Figure S5: Acute (0.2% $O_2$) and prolonged (48h) hypoxia downregulated TAZ but not YAP expression in Human bronchial epithelial cell lines.**

**A**) Expression of YAP and TAZ protein and their phosphorylated forms evaluated by western blot in BEAS-2B, A549, H1299, H1915 and H2030-BrM3 cultivated for 48 hours in normoxia or hypoxia (0.2% $O_2$, in a hermetic hypoxia chamber (INVIVO2, Ruskinn) (representative experiment).

**B-C)** Densitometric analysis of TAZ and phosphoTAZ respectively.

**D-E**) Densitometric analysis of YAP and phosphoYAP respectively.

**F**, **H** and **I**) Immunostaining of YAP, TAZ and HIF-1A respectively on Human bronchial epithelial cell lines after 48 hours of normoxia/hypoxia and graphic representation their nuclear intenstity.

**G**) Graphic representation of the mRNAs expression of CTGF and ANKDR1 in A549 and H1299 cell lines after 48 hours of normoxia/hypoxia.

The values are the mean +/- SEM of 3 independent determinations. T-test analysis P-value * P <0.05, ** P <0.01 and *** P <0.001 (SEM n≥3).

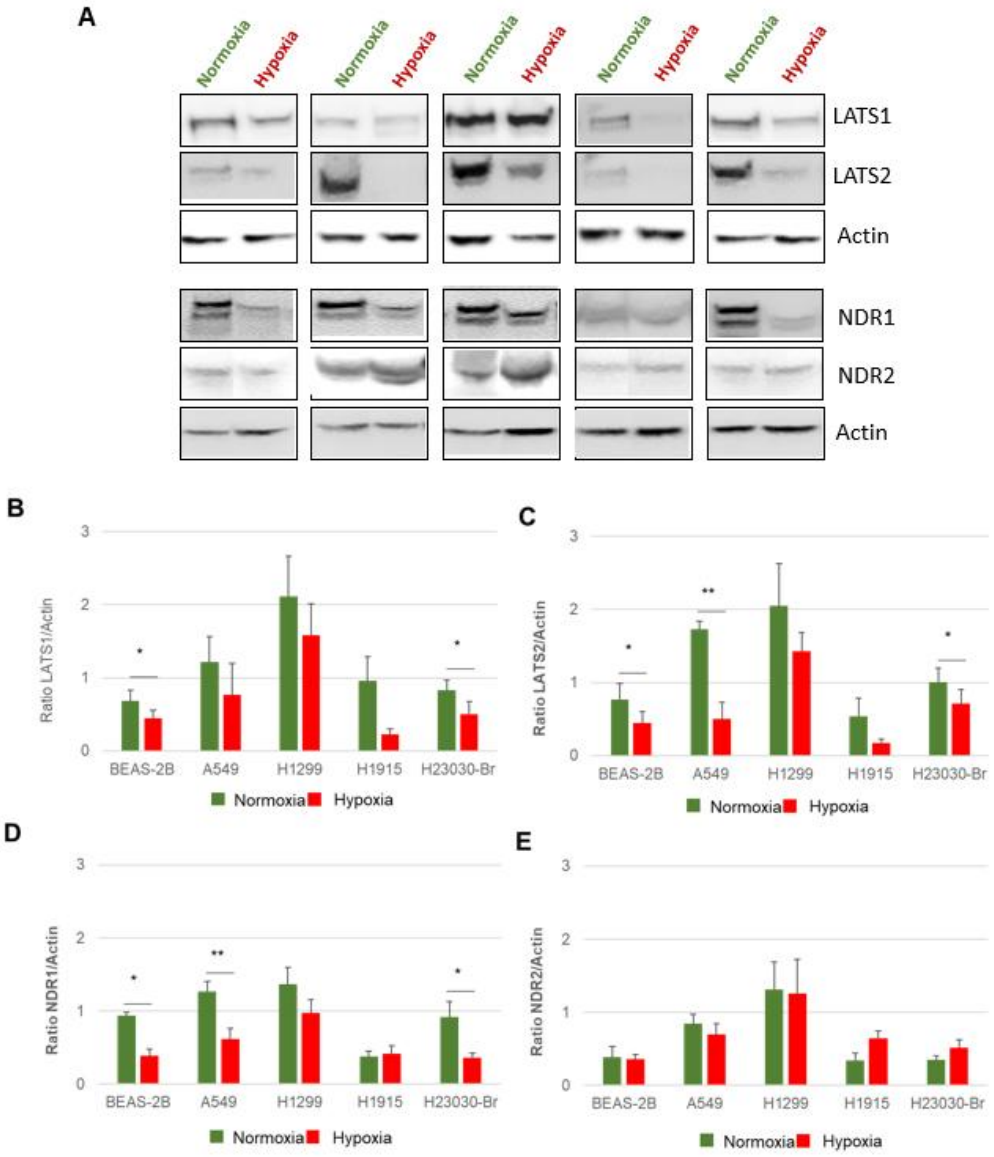


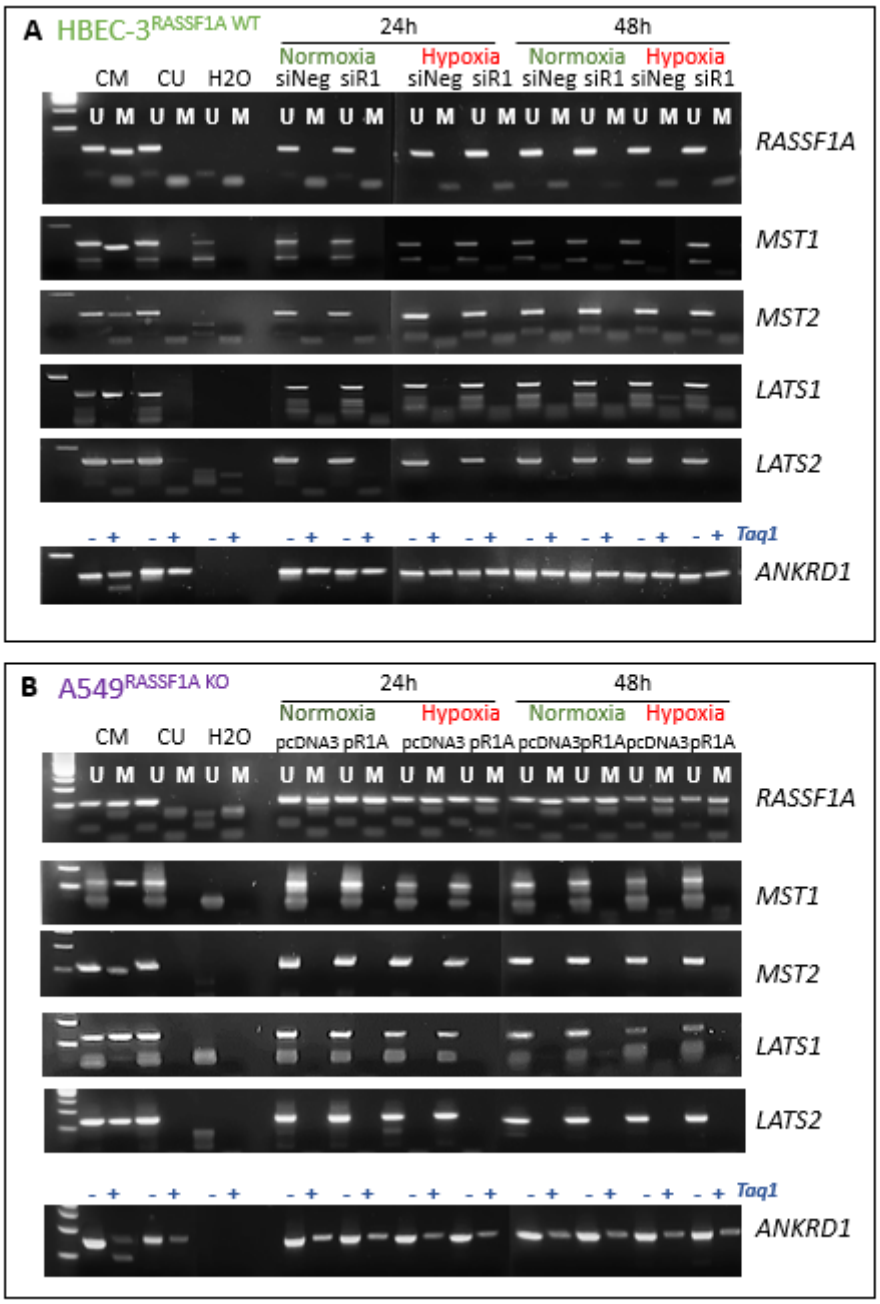

**Figure S6**: **Acute (0.2% $O_2$) and prolonged (48h) hypoxia downregulated Hippo kinases excepted for NDR2 expression in Human bronchial epithelial cell lines.**

**A** ) Expression of LATS1/2 and NDR1/2 protein and evaluated by western blot in BEAS-2B, A549, H1299, H1915 and H2030-BrM3 cultured for 48 hours in normoxia or hypoxia (0.2% $O_2$, in a hermetic hypoxia chamber (INVIVO2, Ruskinn)) (representative experiment).

**B-C**) Densitometric analysis of LATS1 and LATS2, respectively.

**D-E**) Densitometric analysis of NDR1 and NDR2, respectively.

The values are the mean +/- SEM of 3 independent determinations. T-test analysis * p> 0.05; ** p> 0.01




M: methylated U: unmethylated CU: unmethylated control CM: methylated control

**Figure S7: Hypoxia at 0.2% O2 for 48 h does not modulate the methylation status of promoters of genes encoding members of the Hippo pathway in HBEC-3 and A549 cells.**

DNA methylation was assessed by specific methylation PCR and Cobra PCR in HBEC-3 (A) and A549 (B), expressing or not RASSF1A, after 48 h of normoxia/hypoxia. Lymphocyte DNA is used as a negative control (CU: unmethylated control) and the positive methylation control is cpGenome Universal methylation DNA (CM: methylated control). (n=3)

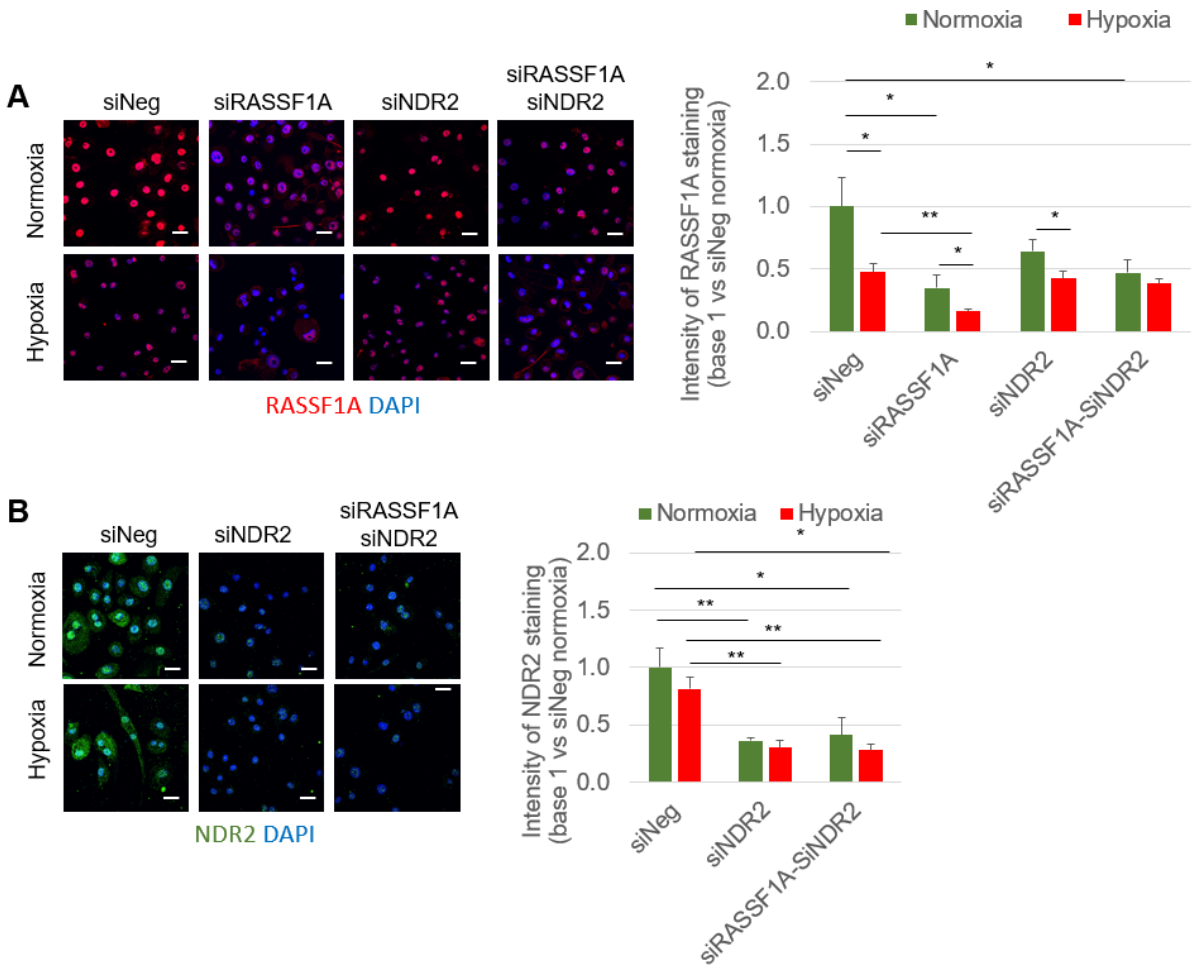



**Figure S8: Immunostaining of RASSF1A (A) and NDR2 (B) on HBEC-3 expressing or not RASSF1A and NDR2, after 48h of normoxia/hypoxia**. Graphic representation of staining intenstity. * p <0.05, ** p <0.01 (SEM n=3).

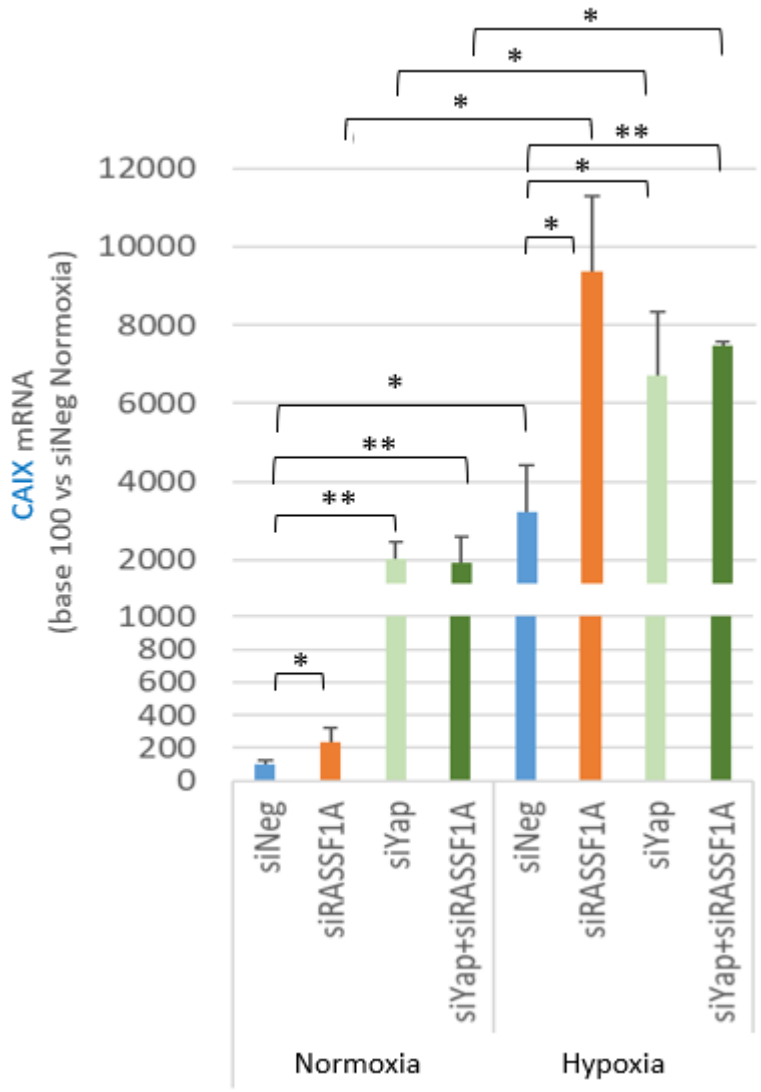



**Figure S9: Expression of *CAIX* mRNA in HBEC-3 cell after 48 h of normoxia/hypoxia expressing or not RASSF1A or YAP.**

Values are means ± SEM expressed in base 100 over siNeg in Normoxia. P-value *p<0.05, **p<0.01.

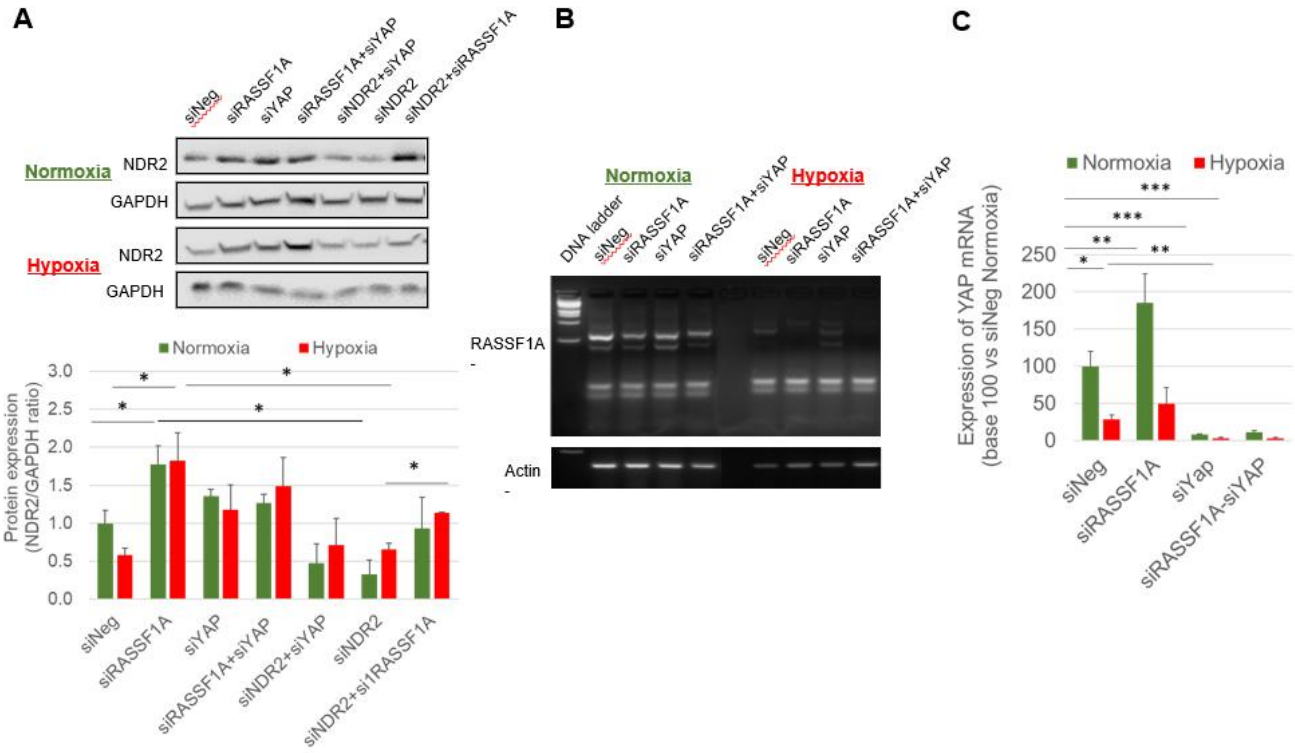



**Figure S10: (A)** Western blot of NDR2 protein on HBEC-3, expressing or not RASSF1A, YAP, or NDR2, after 48 h of normoxia/hypoxia and associated quantification (lower panel). (**B**) Representatif RT-PCR showing RASSFIA mRNA expression on HBEC-3 expressing or not RASSF1A and YAP, after 48h of normoxia/hypoxia. (**C**) Expression of YAP mRNA in HBEC-3 cell after 48 h of normoxia/hypoxia expressing or not RASSF1A or YAP. P-value * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 (SEM n≥3).

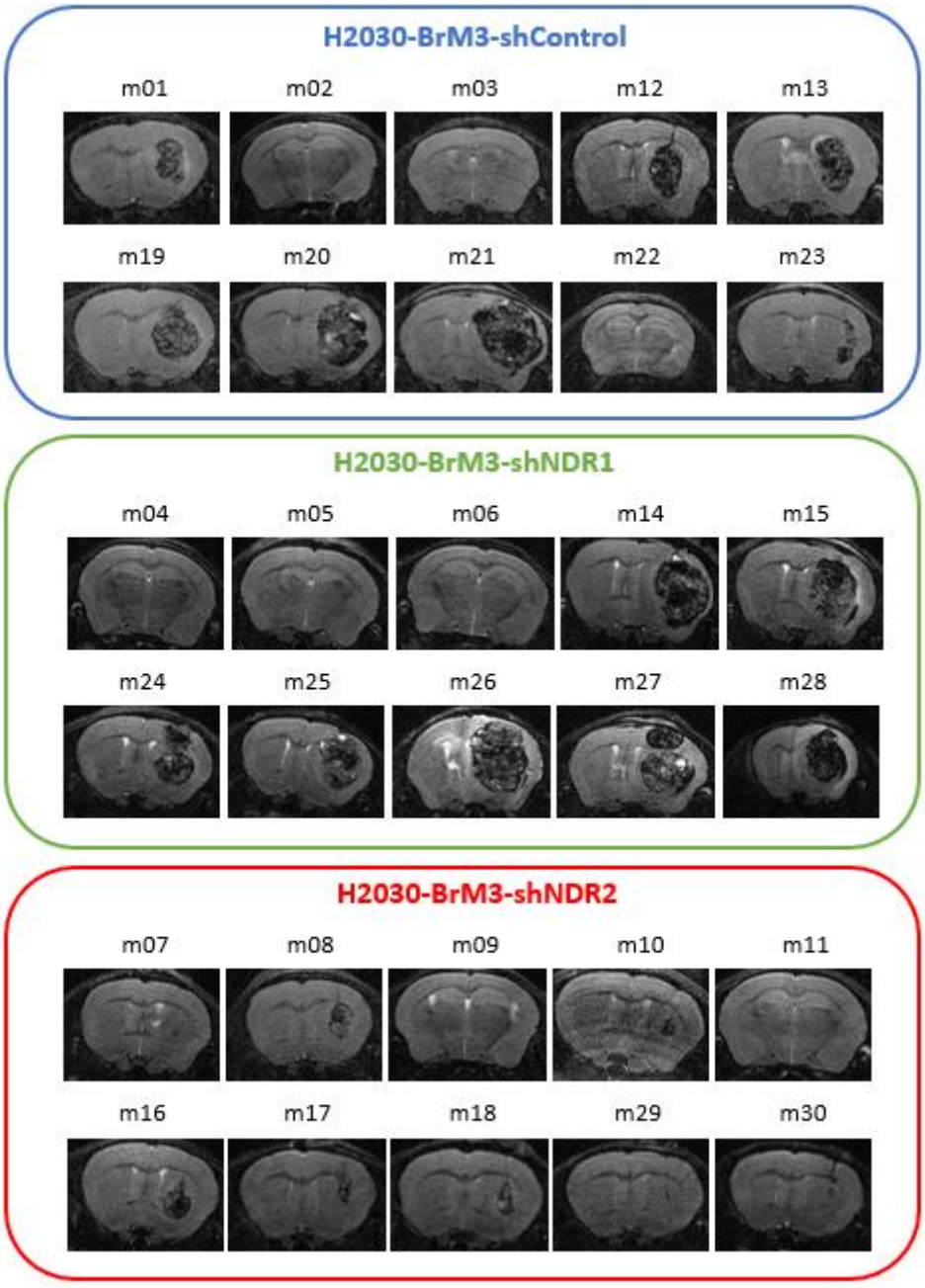



**Figure S11:** T2w MRI images for all mice 24 days after intra-striatal injection of H2030-BrM3 cells for the three different groups (shControl, shNDR1 or shNDR2). T2-weighted imaging by rapid spin echo or RARE8 (Rapid Acquisition Relaxation Enhanced 8) sequence is then acquired with the following parameters: TR/TEeff = 5000/65 ms, number of repetitions = 3, 20 slices, resolution = 0.078x0.078x0.5 mm3, acquisition time = 2 minutes.

Dans notre étude, comme celle de Keller et al., 2019, nous avons confirmé que NDR2 exerce des effets indépendants et indirects de la voie Hippo et de YAP-1/TAZ dans la carcinogenèse bronchique. Afin de mieux comprendre les multiples rôles de NDR2 dans la progression tumorale des CBNPC, nous avons cherché à identifier ses partenaires moléculaires. Notre première approche, fondée sur la recherche de protéines présentant le motif consensus de phosphorylation reconnu par NDR2, s'est révélée limitée. Nous avons donc entrepris la réalisation d'un interactome de NDR2, afin d'identifier un large éventail de protéines interagissant avec cette kinase, qu'il s'agisse de régulateurs en amont ou de cibles potentielles en aval, et ainsi mieux décrypter ses fonctions dans la progression tumorale.

# Résultats Partie II

## Identification de l'interactome de la kinase NDR2 dans les cellules de CBNPC

Cette partie se propose de prédire le rôle de la kinase NDR2 dans divers processus physiologiques, ainsi que sa contribution à la tumorigenèse, en révélant les partenaires encore méconnus de cette kinase. Afin d'approfondir certains aspects de son fonctionnement, une analyse comparative sera menée avec la kinase homologue NDR1, qui partage près de 90 % d'identité de séquence avec NDR2 et dont les fonctions sont, à ce jour, mieux caractérisées. Cette approche permettra également de mettre en évidence les spécificités fonctionnelles propres à NDR2, notamment dans l'autophagie.

International Journal of Biological Macromolecules 311 (2025) 143656

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

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

Review

# NDR2 kinase: A review of its physiological role and involvement in carcinogenesis

Tiphaine Biojout [a], Emmanuel Bergot [a,b], Benoit Bernay [c], Guénaëlle Levallet [a,d,*], Jérôme Levallet [a]

[a] Université de Caen Normandie, CNRS, Normandie Université, ISTCT UMR6030, GIP CYCERON, F-14000 Caen, France
[b] Centre Hospitalier Universitaire de Caen Normandie, Département de Pneumologie et d'Oncologie thoracique, F-14000 Caen, France
[c] Université de Caen Normandie - Plateforme PROTEOGEN, US EMerode, 14032 Caen, cedex 5, France
[d] Centre Hospitalier Universitaire de Caen Normandie, Département de Pathologie, F-14000 Caen, France

ARTICLE INFO

*Keywords:*
NDR2
cancer
Therapeutic target
Lung cancer
Hippo pathway

ABSTRACT

The Hippo kinase, NDR2, plays a key role in the natural history of several human cancers, particularly lung cancer, by regulating processes such as proliferation, apoptosis, migration, invasion, vesicular trafficking, autophagy, ciliogenesis and immune response. To examine the specificity of NDR2's action, interaction and function in physiological or tumoral contexts, we first focus on the structural differences in the amino-acid sequence between NDR1 and NDR2. We then establish a correlation between these NDR1/2 differences and specific post-translational regulation, as well as the distinct action, interactions, and functions of NDR2 in physiological or tumoral paradigms, such as lung cancer. Furthermore, the full set of NDR2 partners and/or substrates remains to be identified. Given that it is hypothesized that NDR2 and its partners may offer new perspectives for anticancer therapies, we emphasize potential clustering or functional enrichment networks among the NDR2-specific interactants. Additionally, we provide an unpublished proteomic comparison of the NDR1 versus NDR2 interactome, focusing on human bronchial epithelial cells (HBEC-3), lung adenocarcinoma cells (H2030), and their brain metastasis-derived counterparts (H2030-BrM3). In conclusion, this study underscores the pivotal role of NDR2 in cancer progression, particularly lung cancer, and helps to better understand their specific functions and interactions in both normal and tumor contexts. The identification of NDR2 partners and substrates remains essential, with the potential to open new avenues for anticancer therapies.

## 1. Introductory overview

The serine/threonine kinase NDR was initially identified in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* [1]. It was later described in *Neurospora crassa* [2], in Drosophila homolog [3], and in human cells and designated NDR1/2 kinases [4].

In mammals, the NDR/LATS kinase family consists of four members: NDR1 (STK38), NDR2 (STK38L), LATS1 and LATS2. These proteins belongs to the subclass of serine/threonine protein kinases A, G and C (AGC) in the Hippo signaling pathway, a tumor suppressor pathway [5]. Members of the NDR/LATS kinase family are involved in a wide range of biological processes, including cell division and morphology, regulation of infection and inflammation as well as apoptosis and tumor suppression [6,7]. Comprehensive and details reviews outline the functions and roles of NDR1/2 kinases in the Hippo signaling pathway [6] and in various aspects of human physiology and pathology, including cancer [8–10]. Due to their structural similarity [11], NDR1/2 kinases are often treated as interchangeable; however,NDR1 and NDR2 actually play distinct or even opposing roles in cancer. For instance, NDR1 has been shown to suppress the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and subsequent metastasis of prostate cancer cells [12,13], while NDR2 has been implicated in the invasion and cytokinesis defects of lung cancer cells [14] and the brain metastasis of non-small cell lung cancer (NSCLC) [15]. The current lack of knowledge regarding NDR2 compared to other NDR kinases is addressed in this review, which focuses on the differences in action, interaction and functions of NDR2 kinase.

* Corresponding author at: ISTCT-UMR6030, OncoCARE group, Avenue H.Becquerel, 14074 Caen, France.
*E-mail address:* guenaelle.levallet@unicaen.fr (G. Levallet).

https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143656
Received 26 December 2024; Received in revised form 4 April 2025; Accepted 28 April 2025
Available online 29 April 2025
0141-8130/© 2025 Published by Elsevier B.V.

## 2. Structure and regulation of NDR1/2 kinases: Similarities and differences

### 2.1. Regulation of NDR1/2 activity

#### 2.1.1. The Canonical signaling pathway

The activation of NDR1/2 is a multistep process involving binding of MOB1 (Mps-One-Binder 1 protein), an allosteric co-activator, auto-phosphorylation of S281/282 which is necessary for full activation of NDR1/2 and phosphorylation of the hydrophobic motif site T444/442 by upstream MST kinases [16–19]. The adaptor protein MOB1 is phosphorylated by MST1/2 to form the MOB1/NDR1/2 complex [5,8]. MST1/2 and MST3, another member of the MST kinase family, can phosphorylate and activate NDR1/2 on the hydrophobic motif phosphorylation siteT444/442 [5,20,21]. The binding of co-activators, MOB1A/B or MOB2, to the NTR domain of NDR1/2 releases the auto-inhibition exerted in the catalytic domain by the basic residue-rich insert (autoinhibitory sequence (AIS), residues 244–276 in NDR1). This release allows for efficient autophosphorylation of S281/282, located in the activation segment, thereby enhancing NDR1/2 activity [11,22]. However, MOB2 also acts as a competitive antagonist of MOB1A, preventing the autophosphorylation of NDR1/2 and consequently blocking their activity [19,23]. Conversely, both S281/282 and T444/442 can be dephosphorylated by protein phosphatase type 2 A (PP2A) [24]. Furry (FRY) is a critical regulator of NDR1 activation, functioning as a scaffold that binds to both NDR1 and MOB2, thereby synergistically activating NDR1 with MOB2 [25]. In the FRY- Knock-out (KO) cells, the activities of NDR1 and NDR2 responsible for the phosphorylation of YAP-1 were suppressed, suggesting that NDR2 may also be regulated by Fry binding [26]. However, depletion of FRY did not affect LATS1/2 kinase activities [25].

#### 2.1.2. Additional actors of the NDR1/2 regulation

NDR1/2 kinases are also controlled by a calcium-dependent mechanism. This process involves the binding of the S100B activator to the NTR domain of NDR1/2 which releases the autoinhibitory motif and promotes the autophosphorylation of S281/282 [20,27,28]. Other kinases can control NDR1/2 by adding a phosphate group to T444/442 on the hydrophobic motif. For example, MAP4K-type kinases [10,29] or PDK1 can activate NDR2 during insulin-like growth factor 1 (IGF-1) signaling, promoting cell survival and invasion [30].

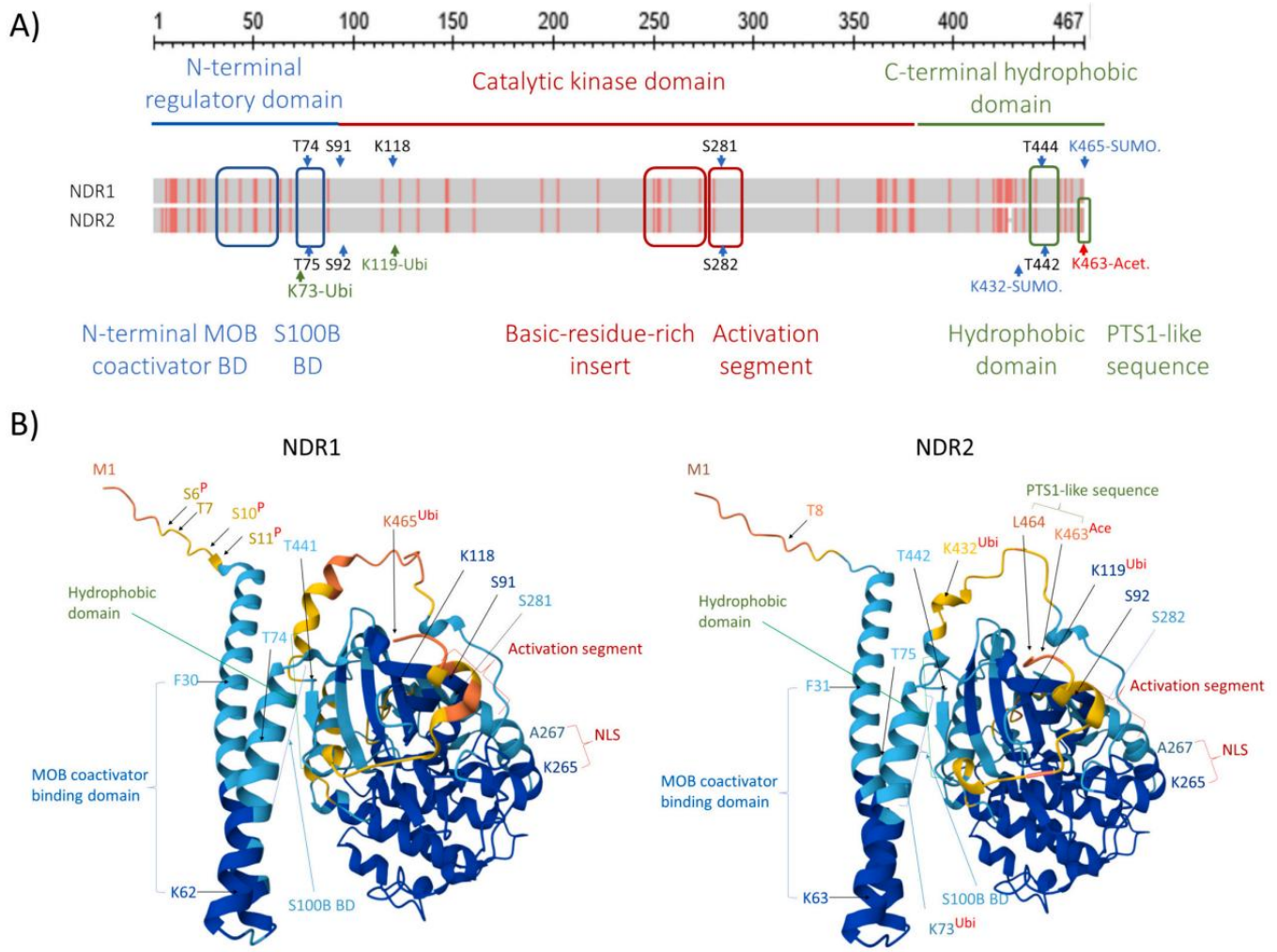



**Fig. 1.** 2D/3D sequence comparison between NDR1 and NDR2 kinases. A. 2D sequence alignment of NDR1 and NDR2. The functional domains: N-terminal MOB coactivator binding domain (BD), S100B binding domain (BD), Basic-residue-rich insert, Activation segment, Hydrophobic domain and PTS1-like sequence were boxed. Phosphorylation, SUMOylation (SUMO.), Acetylation (Acet.) and Ubiquitination (Ubi) sites are numbered and located by arrowhead. (For more details, see Supplemental Fig. 1) B. 3D predictive sequence NDR1 and NDR2. Functional domains and posttranscriptional modification site are localized. The same caption is used for panel A and B.

### 2.2. NDR1/2 kinases: Sequence and structure

The NDR2 kinase exhibits a domain organization analogous to that of NDR1, with an 87 % similarity [11], and an 66 % to LATS1/2 kinases [27,28].

#### 2.2.1. Key residues involved in NDR1/2 activity conserved between NDR1 and NDR2

In the catalytic kinase domain, the highly conserved domain (93 % similarity) between NDR1 and NDR2, includes (Fig. 1 and Supplemental Fig. 1): i) K118, which is involved in ATP binding [31], ii) two key regulatory phosphorylation sites [32], S282 (S281 in NDR1) in the activation segment and T442 (T444 in NDR1) in the hydrophobic motif at the C-terminal, iii) T74 and S91, which are involved in NDR1 binding to S100B activator [27] and stability [33], respectively. The phosphorylation of S91 by the MAPKK kinase (MAP3K) MEKK2 prevents the cleavage of NDR1 by heat and calpain. This demonstrate that S91 is important for the stability of NDR1 [20] and potentially for NDR2 as this phosphorylation site (S92) is conserved in the NDR2 sequence.

#### 2.2.2. Potential site of regulation not conserved between NDR1 and NDR2

Amino acid (AA) variations have been identified at other sites of phosphorylation, which may consequently impact the structure, function and regulation of these two kinases in a distinct way.

In the N-terminal regulatory domain (NTR) of NDR1, the glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) phosphorylates S6 and T7, thereby inhibiting NDR1 full activation [31]. This process is largely dependent on a PKA-mediated priming phosphorylation at residues S10 and S11, respectively [34]. However, this mechanism may be specific to NDR1, as, with the exception for T8, these phosphorylation sites are absent in the NTR of NDR2.

#### 2.2.3. Posttranscriptional modification of NDR1/2 kinases

In addition to the phosphorylation sites, other amino acids have been shown to play a role in post-transcriptional modification (PTM) such as ubiquitination, SUMOylation or acetylation resulting to differential regulation of NDR kinases activities. SUMOylation, a highly dynamic and rapidly reversible PTM process with a similar enzymatic machinery to ubiquitination, inhibits the S282/T444 phosphorylation and subsequent activation of NDR2 [35]. The SENP2 (Sentrin/small ubiquitin-like modifier (SUMO)-specific proteases (SENPs)) targets NDR2 for de-SUMOylation at K432, enhancing NDR2 kinase activity and leading to p21 inhibition and cell cycle progression, which contributes to lung cancer cell growth [35]. NDR1 is also a target for SUMOylation, but at K465, the last AA residue of the NDR1 protein. However, this PTM has a minimal effect on NDR1 kinase activity and subcellular localization [36].

Lysine at position 463 (K463) in NDR2, analogous to K465 in NDR1, is not a SUMOylation site [36] but instead an acetylated site in NDR2. Acetylation of K463 is regulated by p300/CBP acetyltransferases and SIRT1 deacetylase [37], but consequences of acetylation on NDR2 activity and function remain unknown [35,37].

Cell starvation induced TRIM27-dependent ubiquitination of NDR2 at K73 and K119, resulting in its activation rather than its ubiquitin-mediated proteasomal degradation. This process forms a molecular complex that regulates autophagy and tumorigenesis [38]. Ubiquitination appears to be a common process regulatory mechanism for NDR/LATS kinases, potentially involving multiple E3 ligases. However, its impact on protein stability and subsequent kinase activity and function is isoform-specific for each Hippo kinase [39]. In response to hypoxia, the E3 ubiquitin ligase SIAH2 stimulates YAP-1 by destabilizing LATS2 in a human breast cancer cell line [40]. The protein sequence alignment between LATS2 and NDR2 reveals that the target sequence of SIAH2 is partially conserved in NDR2, suggesting that NDR2 could be a potential substrate of SIAH2 and thus regulated by hypoxia, in line with our recently published results in lung cancer and brain metastasis from NSCLC [15].

### 2.3. Tissue specificity and subcellular localization

Although NDR1/2 share a high degree of similarity, each kinase exhibits distinct cellular expression and subcellular localization, suggesting that each kinase may have non-redundant functions. NDR2 is predominantly expressed in the brain [41–43], heart, thymus [11], small intestine, stomach and testis [31]. While both NDR1/2 share a nuclear localization signal (NLS)-like sequence located in the auto-inhibitory sequence (AIS) [31,32], the subcellular localization of NDR2 is mainly cytoplasmic, close to cytoskeletal elements or to the plasma membrane [11] or in centrosomes [16].

## 3. Specific functions of NDR2 kinase and its role in cancer

### 3.1. Functional activity of NDR1/2

In the Hippo pathway, activated NDR1/2 regulate the activity of their main downstream effectors YAP-1 and TAZ [8]. Phosphorylation of YAP-1/TAZ on multiple serine/threonine residues including S127 induces their cytoplasmic retention and 14–3-3-mediated proteasomal degradation [6,29]. YAP-1/TAZ proteins lack a DNA-binding domain and exert their effects mainly through association with DNA-binding proteins, with the TEAD proteins being their major partners. These interactions regulate the expression of target genes and have diverse physiological and pathological effects [44]. Indeed, YAP-1/TAZ proteins are closely associated with enzyme activity, cell proliferation, differentiation, tissue and organ growth and the production of proinflammatory factors [6].

Whether NDR1/2 functions are mainly mediated through the phosphorylation of the YAP-1/TAZ co-activator, the consensus phosphorylation motif, HXRXXpS/T [6], can also be found in other target substrates of NDR1/2 kinase. Some of these additional targets have already been identified for NDR1 and/or NDR2 such as Rabin8, p21, Par3 or CDC25A, illustrating the multiple roles of NDR1/2 [6].

The following section will focus on the specific role of NDR2 in different tissues and organs even in cases where no NDR2 substrate has yet been identified (Fig. 2). Deregulation of NDR2 functions contributes to tumor initiation and progression by promoting proliferation through support of cell cycle progression as well as migration and metastasis [45–47]. In addition, NDR2 mediates the transformation of healthy cells into malignant cells by inducing defects in cytokinesis [14,16]. However, NDR2 also plays context-dependent and tissue-specific roles in both oncogenesis and tumor suppression, which will be discussed in the next part and summarized in Fig. 3 (Fig. 3).

### 3.2. NDR2 in organogenesis and brain development

Concomitant KO models for NDR1/2 are not viable. Indeed, simultaneous loss of NDR1 and NDR2 in mice results in embryonic death, presumably due to cardiac malformation. However, this phenotype is not found in NDR1 or NDR2 single KO, suggesting a compensation between the two kinases and demonstrating their critical role in development [48]. This is further illustrated in mouse brain development, where loss of NDR2 disrupts neuronal polarization, preventing proper differentiation [46] and dendritic branching in the hippocampus [41]. For neuronal polarity, both NDR1/2 kinases can phosphorylate Par3 at S383 in a non-consensus sequence SPGRFpS. Phosphorylation at S383 inhibits the interaction of Par3 with dynein, thereby polarizing Par3 distribution and strengthening axon specification [49]. However, the regulation of integrin-dependent dendritic and axonal growth in mouse hippocampal neurons has only been demonstrated for NDR2 [41,50]. NDR2 induces phosphorylation at the T788/789 site of β1-integrin, a critical site for activity and trafficking, to stimulate PKC and CaMKII-dependent activation of β1-integrins and their exocytosis [41]. The

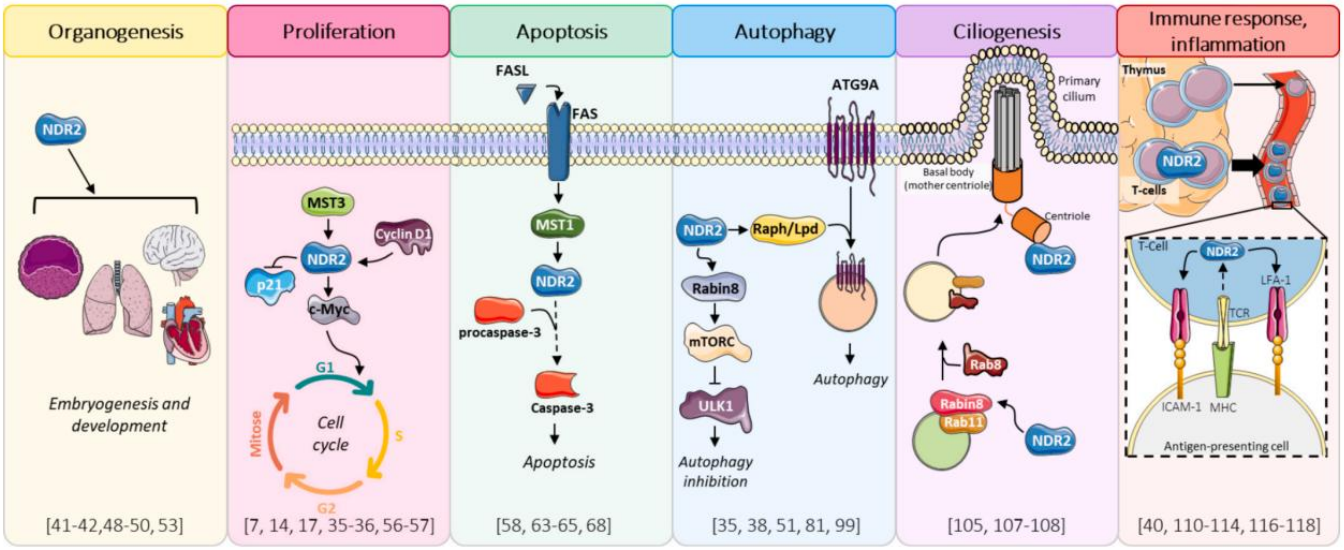



**Fig. 2.** Roles of NDR2 in Physiological Processes.
NDR2 is an essential protein involved in several biological processes. It plays a key role in organogenesis, particularly in the embryonic development of the brain and lungs. NDR2 promotes cell proliferation by being activated by MST3 and cyclin D1, which inhibits p21 and activates c-Myc. In apoptotic processes, NDR2 is activated by FASL/FAS signaling, which stimulates caspase-3 activity. Regarding autophagy, NDR2 has a dual role: it inhibits autophagy via Rabin8/mTORC while promoting it through Raph/Lpd, facilitating the transport of ATG9 A to endosomes for autophagosome formation. NDR2 is also involved in ciliogenesis by activating Rabin8, which aids in the transport of vesicles necessary for their assembly. Finally, NDR2 contributes to the immune response and inflammation by facilitating the migration of T cells and activating LFA-1 during antigen recognition.
NDR2: Nuclear Dbf2-related kinase 2 Cell Proliferation. MST1: Mammalian STE20-like protein kinase 1. Myc: Myelocytomatosis oncogene. p21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A (CDKN1 A).FASL: Fas Ligand. FAS: Fas (CD95, APO-1). ATG9 A: Autophagy-related protein 9A. mTORC: Mammalian Target of Rapamycin Complex Raph/Lpd: Ras-associated and pleckstrin homology domains-containing protein 1 (RAPH1), also known as Lamellipodin. ULK1: Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1. Rabin8: Ras-related protein Rab-8B effector protein. Rab: RAS related GTP-binding protein. ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1. LFA-1: Lymphocyte Function Associated antigen-1. TCR: T cell receptor. MHC: major histocompatibilitity complex.

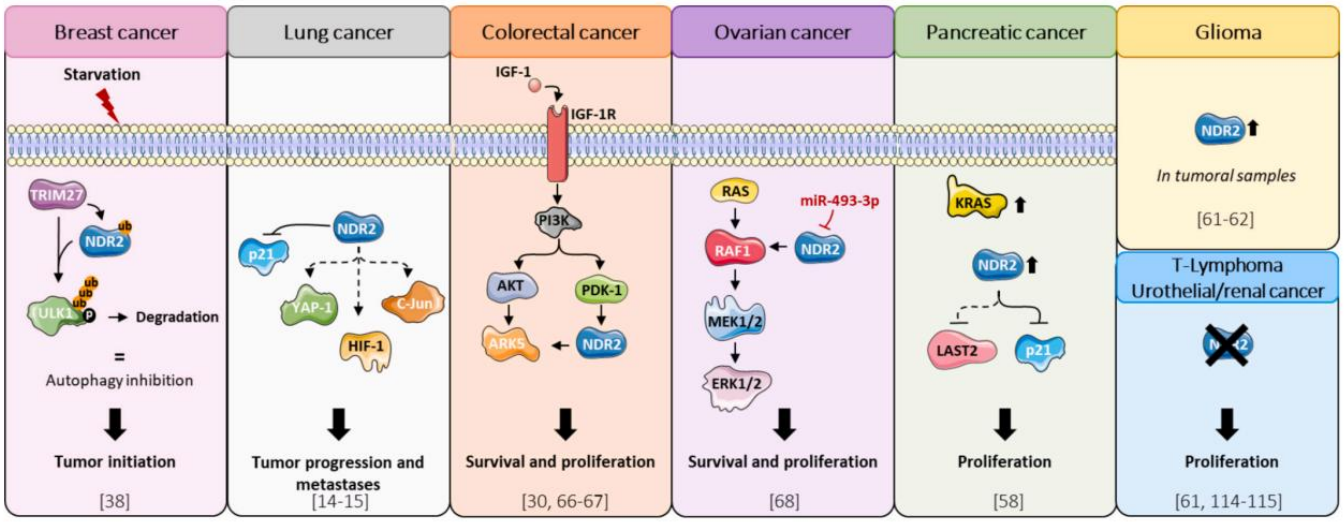



**Fig. 3.** Role of the NDR2 kinase in variety of cancer.
NDR2 plays varying roles in cancer. In breast cancer, NDR2 is activated by TRIM27 under starvation, leading to autophagy inhibition and tumor development. In lung cancer, NDR2 promotes cell proliferation and survival by inhibiting p21 and activating transcription factors like YAP-1, c-Jun, and HIF-1, facilitating tumor progression and metastasis (See Fig. 4 for more details). In colorectal cancer, NDR2 is activated by PDK1 through IGF-1 signaling, enhancing tumor cell survival and proliferation via ARK5 activation. In ovarian cancer, NDR2 activates RAF1, triggering the ERK1/2 pathway to promote tumor cell survival, although miR-493–3p can inhibit this pathway. In pancreatic cancer, elevated NDR2 levels correlate with increased KRAS expression and mutations, supporting tumor cell proliferation by inhibiting p21 and suppressing LATS2. NDR2 expression is also upregulated in gliomas. Conversely, in T-cell lymphomas and urothelial/renal cancer, NDR2 is thought to act as a tumor suppressor, where its inhibition promotes proliferation.
TRIM27: Tripartite motif-containing protein 27. DR2: Nuclear Dbf2-related kinase 2.ULK1: Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1. p21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 A (CDKN1A). YAP-1: Yes-associated protein 1. HIF-1: Hypoxia-inducible factor 1. IGF-1: Insulin-like growth factor 1. IGF-1R: Insulin-like growth factor 1 receptor. PI3K: Phosphoinositide 3-kinase. AKT: Protein kinase B (PKB). PDK-1: 3-Phosphoinositide-dependent kinase 1. LATS2: Large tumor suppressor homolog 2. ARK5: AMPK-related kinase 5. KRAS: Kirsten Rat sarcoma virus protein. RAF1: Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase. MEK1/2: Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2. ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinases 1/2.

authors also suggest that NDR2 may regulate α-integrin trafficking via Rab-dependent transport mechanisms, as NDR2 can associate with Rab5 and Rab11 in positive integrin recycling vesicles [41]. Additionally, the Rab-8 guanine exchange factor, Rabin8, is a substrate for NDR1/2 kinases [51]. In addition to β1 integrin subunit activation, NDR2 regulates α1 integrin trafficking, thereby controlling neurite growth [50]. NDR2 also interacts with actin cytoskeleton, regulating structural processes in differentiating and mature neuronal cells [42], During neurite outgrowth, the RhoA GTPase signaling pathway and SAX-1, the NDR kinase orthologue in *C. elegans*, share a common function [52], confirming that NDR2 may be involved in neuronal functions [42].

By controlling neuronal polarity, NDR2 prevents the formation of supernumerary axons in the hippocampus. Excessive expression of NDR2 in the mouse brain, particularly in the granular cells of the gyrus dente, disrupts the activity of the hippocampal network [53]. Such overexpression of NDR2, due to gene amplification, induces the development of intellectual disability in mouse [54].

### 3.3. NDR2 in cell proliferation and cytokinesis

The cellular functions of NDR kinases in cell cycle progression and tissue growth are well established [6,7,43,55]. The NDR1/2 kinases control progression to the G1 phase by promoting the stabilization and activity of c-myc and p21/Cip1 [7,56]. This occurs through the binding of NDR1/2 to c-myc, independent of NDR kinase activity [56], and phosphorylation of p21 in S146 (KRRQTpS) [7]. NDR1/2 activity peaks in G1 phase and remains at a certain level in S phase. In this phase, NDR1/2 phosphorylates/inhibits the cell cycle inhibitor p21 and thus controls the G1/S cell cycle transition [7,56]. As mentioned in section 2.3, NDR2 possess a SUMOylation site at position K432 in an inverted consensus motif DYK, a residue absent in the NDR1 sequence. De-SUMOylation of K432 by (SUMO)-specific proteases (SENPs) leads to NDR2 activation, increases instability of the downstream target p21, and accelerates G1/S cell cycle progression [35]. Inhibition of SENP2 in lung cancer cells has been shown to increase the half-life of p21 [35].

Cyclin D1/Cdk4 are other critical protein kinases regulating cell cycle progression, particularly in the G1 phase. Cyclin D1 promotes cell cycle progression by enhancing NDR2 kinase activity through phosphorylation of S282, but independently of Cdk4 [57]. NDR2 interacts with cyclin D1, enhancing NDR2 phosphorylation, stimulated by MOB1A or MST1. However, overexpression of Cdk4 inhibits the interaction between NDR2 and MST1, without affecting the association of NDR2 with MOB1A [57]. Although Cyclin D1 and NDR2 do not phosphorylate each other, Cyclin D1 promotes NDR2 autophosphorylation by releasing its self-inhibition motif. Activated NDR2 can then phosphorylate p21, promoting its degradation and thus supporting the cell cycle progression [57]. Indeed, NDR2 depletion increases expression of the kinase LATS2 and the cell cycle regulator p21, which together promote the loss of cell viability in a subset of KRAS-dependent pancreatic cancer cell lines [58].

Another critical step in cell cycle progression is proper cytokinesis, which requires centriole formation and centrosome duplication. Human NDR directly contributes to centrosome duplication through a mechanism that requires Cdk2 activity. However, the direct substrates of NDR kinase on centrosomes remain unidentified [16,17]. These experiments focus on NDR1, but overexpression of functional NDR2 causes centrosome amplification and the formation of subsequent polynucleated cells [17].

A defect in cytokinesis is observed in the HBEC-3 cell line (bronchial origin) with the loss of the tumor suppressor RASSF1A, which promotes NDR2 activity. NDR2 interacts directly with GEF—H1, a RhoB GDP-GTP exchange factor containing the NDR phosphorylation consensus motif HXRXXS/T, resulting in its inhibition and downregulation of RhoB [14]. In *Saccharomyces cerevisiae,* the kinase Cbk1, an Ndr/LATS-related protein, regulates mitotic exit and daughter cell separation after cytokinesis [59]. Centrosome abnormalities (increased size and number) due to cytokinesis defects create chromosomal instability, which promotes tumor development and progression [16,60].

Genome-wide association studies in glioma have identify a novel locus associated with glioma risk corresponding to the NDR2 gene [61,62]. NDR2 is expressed 1.8-fold more highly in glioma samples than in healthy samples. However, according to the Human atlas protein (HAP) database (Supplemental Fig. 2), NDR2 expression does not appear to correlate with overall survival (OS) in glioma patients.

### 3.4. NDR2 in apoptosis

NDR1/2 are proapoptotic kinases and their knockdown results in resistance to apoptosis [63]. Stimulation of death receptors Fas and TNFa receptor, indirectly stimulates NDR1/2 kinases by promoting phosphorylation through MST1 on their hydrophobic motif (T444 /442). Both NDR1 and NDR2 isoforms mediate Fas-induced apoptosis, as evidenced by the significant reduction in cell death observed upon NDR1/2 KO. Furthermore, overexpression of NDR1 kinase enhances apoptosis in MCF7 cells [64].

MICAL-1 (molecule interacting with CasL) is atypical multidomain flavoenzyme that negatively regulates the activation of NDR1/2 kinases by competing with MST1 for NDR1/2 binding. By doing so, MICAL-1 inhibits the MST1-NDR2 signaling and apoptotic pathway [65]. The authors demonstrated that the KO of NDR1/2 resulted in the inhibition of caspase-3 cleavage induced by etoposide. Conversely, the KO of MICAL-1 increases signals for cleaved caspase-3 [65].

NDR2 also plays a role in regulating ARK5 (a member of the AMP-activated protein kinase (AMPK)2 catalytic subunit family), which is closely implicated in tumor progression, particularly during insulin-like growth factor (IGF)-1 signaling. NDR2 promotes cell survival and invasion of colorectal cancer (CRC) cell lines by phosphorylating and activating ARK5 [30]. During IGF-1 signaling, NDR2 is activated by phosphorylation of three residues: T75 (required for interaction with S100B), S282 (MOB-mediated autophosphorylation) and T442 (in a PDK-1-dependent manner). Notably, PDK-1 is not involved in the phosphorylation of the C-terminal threonine in NDR1 [24]. Activated NDR2 then phosphorylates the conserved threonine T211 in a non-consensus NDR kinase site (DKFLQT) on the active T-loop of ARK5, promoting cell survival and invasion of colorectal cancer cells [30].

However, the role of NDR2 in CRC is unclear. The *STK38L* gene, which encodes NDR2, can be mutated and is involved in CRC tumorigenesis [30,66]. Nevertheless, NDR2 protein expression is progressively silenced during chemically-induced colon carcinogenesis in mice models [67]. In the majority of colon cancer tissue microarray samples, NDR2 and YAP-1 protein levels exhibited an inverse correlation, suggesting that NDR2 may play a tumor-suppressive role in human CRC [67]. In the HAP database (Supplemental Fig. 2), NDR2 expression is not association with OS in CRC patients.

In ovarian cancer cells, NDR2 phosphorylates the proto-oncogene RAF1 at S621, promoting its binding to 14–3-3 proteins and preventing its proteasomal degradation [68]. The oncogenic action of NDR2 is inhibited by miR493–3p, which downregulates NDR2 mRNA and protein levels. This interaction enhances apoptosis in ovarian tumor cells. In the HAP, NDR2 expression correlates with significantly poorer patient OS ($p = 0.031$, $n = 349$)(Supplemental Fig. 2).

In pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), a highly aggressive malignancy associated with poor clinical prognosis, high expression of NDR2 correlates with worse OS [58]. In KRAS-dependent pancreatic cancer cell lines, RNAi-mediated depletion of NDR2 inhibits cellular proliferation and induces apoptosis. Concomitantly, NDR2 depletion resulted in increased expression of the cell cycle regulator p21 and LATS2 kinase, but had no effect on NDR1 or LATS1 mRNA transcript levels [58]. The authors concluded that the cytotoxicity associated with NDR2 depletion in KRAS-dependent PDAC cells is mediated, at least in part, by the induction of LATS2 expression. Furthermore, NDR2 and KRAS may function in parallel pathways to promote tumor cell survival.

However, this appears to be tumor context dependent, as NDR2 knockdown fails to induce apoptosis in a KRAS-mutant lung cancer cell line (H358) [58].

The involvement of NDR2 in urothelial and renal cancer has not been extensively studied. However, significant alterations in RASSF1A Hippo pathway molecules (YAP-1, CTGF, and CYR61) have been correlated with disease severity in bladder cancer patients [69,70]. Overexpression of YAP-1 contributes to the progressive features and poor prognosis observed in human urothelial carcinoma of the bladder [71]. In the urothelial cancers database, higher expression of NDR2 is associated with better survival ($p = 0.011$). In contrast, in renal cancer, high expression of NDR2 correlates with worse patient survival ($p = 0.034$) (HAP database (Supplemental Fig. 2)).

### 3.5. NDR2 in migration and invasion

The depletion of NDR2 reverses the migratory and metastatic phenotypes induced by RASSF1A loss in human bronchial epithelial cells (HBEC) [14]. NDR2 affects cytoskeletal conformation by interacting with RhoGTPases, leading to cytoskeletal remodeling, epithelial-mesenchymal transition (EMT), and enhanced cell migration [14]. In addition, NDR2 activates YAP-1 through a non-canonical Hippo pathway, thereby promoting EMT [14]. The findings are consistent with the role of the NDR2 kinase in regulating cell movement via modulation of YAP-1 activity [72]. In NSCLC cells, NDR2 acquires pro-metastatic properties. In a mouse metastasis model, loss of NDR2 reduces the size and number of brain metastases whereas NDR1 knockdown had the opposite effect, promoting metastasis [15]. Higher expression levels of NDR2 are measured in metastatic NSCLC compared to localized NSCLC [15]. The hypoxic environment typically found in NSCLC [15], along with epigenetic deregulation [73] stabilizes and activates NDR2, enhancing its activities and contributing to tumor progression and metastasis [72] (Fig. 4).

Integrins plays a crucial role in cancer cells migration and metastasis formation [74]. Since NDR2 regulates integrin trafficking and activation during neuronal development [41,50], it is plausible that NDR2 may also facilitate migration/invasion in tumors by regulating the integrin signaling pathway.

In lung cancer adenocarcinoma, NDR2 expression correlates with poorer patient survival ($p = 0.0033$, $n = 497$, HPA) [75](Supplemental Fig. 2). This correlation highlights NDR2's critical role in tumor progression and metastatic spread in lung cancer. A study demonstrated that the miR-135b enhances the invasive and migratory capabilities of cancer cells in vitro and promotes lung cancer metastasis in vivo [76]. MiR-135b regulates several targets within the Hippo pathway, including LATS2 and NDR2. Conversely, TAZ effector was upregulated in the miR-135b-overexpressing cells. The authors found a link between miR-135b expression, downregulation of LATS2, and the nuclear localization of TAZ, suggesting that these factors could serve as a useful prognostic signature for NSCLC. However, the specific role of NDR2 in this process remains unaddressed.

### 3.6. NDR2 in vesicular traffic

The relationship between NDR2 and vesicular trafficking has not been thoroughly documented. However, some proteins involved in intracellular vesicle trafficking, such as AAK1 (AP-2 associated kinase) and Rabin8, which are known to be substrates of NDR1/2 kinases,

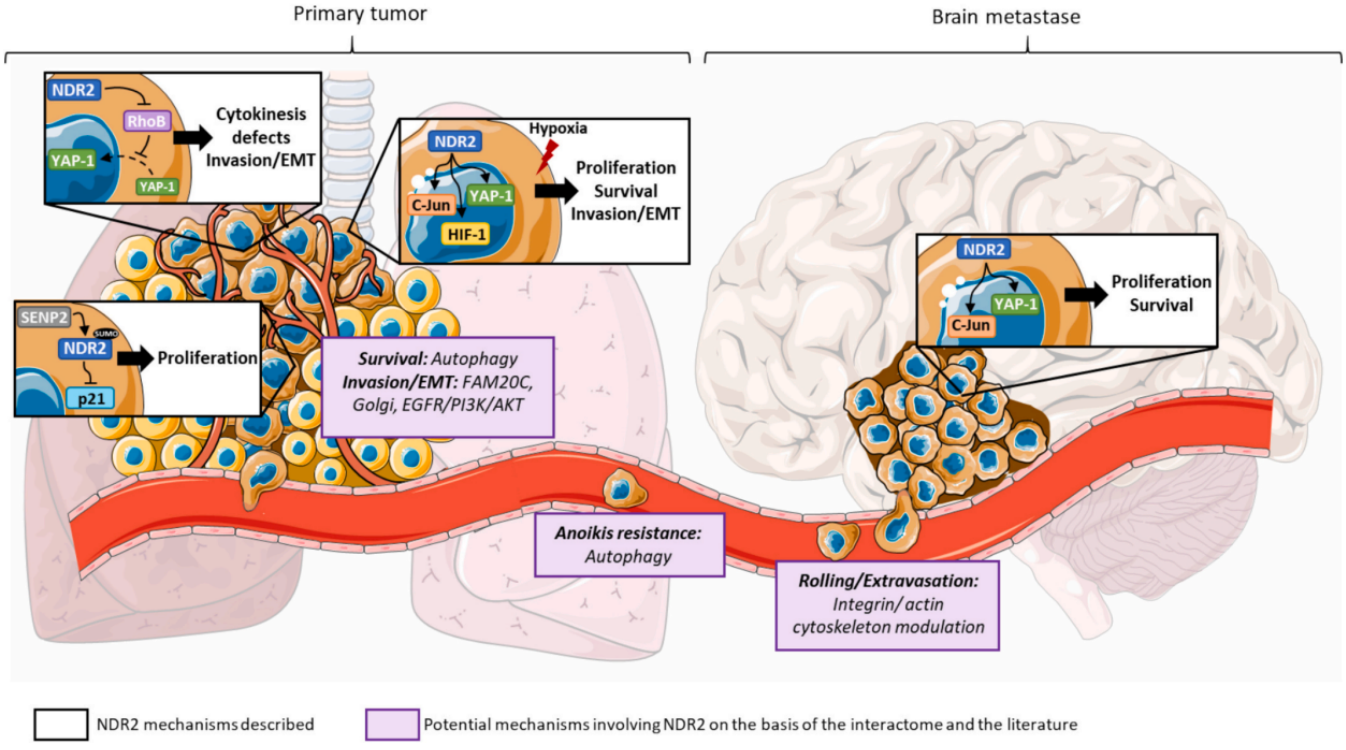



**Fig. 4.** Implications of NDR2 Kinase in NSCLC Tumor Progression.
NDR2 plays a significant role in enhancing the invasive capabilities and proliferation of non-small cell lung cancer (NSCLC) cells by inhibiting RhoB and promoting YAP-1 activation, which leads to cytokinesis defects. It also activates SUMOylation through SENP2, resulting in the inhibition of p21. In a hypoxic microenvironment, NDR2 is activated, inducing oncogenes c-Jun and YAP-1, as well as the hypoxia response via HIF-1, which drives tumor cell survival, proliferation, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), and invasion. In brain metastases, NDR2 similarly promotes tumor cell survival and proliferation. Additionally, NDR2 may regulate autophagy, supporting cell survival under stress conditions like hypoxia and extracellular matrix detachment. It may also interact with key players in migration and invasion, such as FAM20C, the Golgi apparatus, and EGFR signaling. Through its interactions with the actin cytoskeleton or integrins, NDR2 could facilitate tissue colonization by promoting rolling and extravasation. For the abbreviation, see the legends in Figs. 2 and 3.

contain the consensus sequence for phosphorylation by these kinases [51,77,78]. Biosynthetic membrane trafficking from the Golgi complex to the plasma membrane requires the functional association of PI4KB and Rab11fip5 [79,80]. PI4KB promotes membrane trafficking at the post-Golgi and recycling [77], and Rab11fip5 is involved in endosome recycling [78]. Although not yet confirmed as direct substrates and lacking a clear consensus sequence, both PI4KB and Rab11fip5 are phosphorylated at S277 and S307, respectively, and may potential be regulated by NDR1/2 substrates in mammalian cells. In mouse brains, PI4KB, Rab11fip5 and AAK1 have been identified as direct substrates of NDR1/2 [6,51].

Moreover, NDR2 has been shown to interact with the actin cytoskeleton, suggesting that NDR2 may play a role in vesicle or protein trafficking and/or a role in cytoskeletal reorganization or cell polarization by controlling actin phosphorylation and actin filament dynamics [42].

More recently, Roşianu and colleagues report that the NDR1/2 depletion impairs endomembrane trafficking and autophagy through regulation of clathrin-mediated endocytosis and ATG9A trafficking in mouse models [81]. These findings highlight the potential involvement of NDR2 in the regulation of vesicular trafficking and cellular processes dependent on endomembrane dynamics.

### 3.7. NDR2 in autophagy

The cross-talk between the Hippo and autophagy pathways and its implications in physiology and cancer has been well documented [43,82–86]. However, these pathways exhibit complex and reciprocal interactions [82] which align with the dual roles of autophagy in cancer progression [87]. Initially, autophagy inhibits the tumor's development, by promoting cancer cell death. As cancer progresses, autophagy can support tumor invasion and dissemination [87].

In breast cancer, NDR2 inhibits autophagy, thereby promoting tumor development [38]. On the other hand, NDR2 may activate autophagy in neurodegenerative diseases [81] as well as in tumor cells where it contributes to invasion and metastasis. The involvement of the NDR/LATS kinases in autophagy regulation further complicates the picture [84,86]. While, LAST1/2 kinases have been shown to repress autophagy by suppressing mTORC1 activity in mouse models [88], Tang et al. observed that LATS1, but not LATS2, represses autophagy in hepatocellular carcinoma (HCC) cells [89]. This highlights a non-classical, LATS1-mediated interaction between the Hippo signaling pathway and autophagy that may influence therapeutic response and carcinogenesis [90].

The roles of NDR1/2 in autophagy regulation are equally ambiguous and sometimes contradictory. Several studies have highlighted the role of NDR1's involvement in Beclin-1-induced autophagy in both human cells and in Drosophila. NDR1 is activated by the serine/threonine kinase ULK1, facilitating the formation of the Beclin-Exo84-VPS34 complex [81,91,92]. Additionally, NDR1 interacts with XPO1 to modulate the subcellular localization of Beclin-1, thereby regulating the nuclear export of autophagy proteins and other cargoes [93,94]. In contrast, NDR2 inhibits autophagy, particularly by blocking autophagosome formation. This inhibition is facilitated by the phosphorylation of Rabin 8 at S272 by NDR2, which in turn promotes TORC1 activity [95]. Consequently, TORC1 suppresses ULK1, a key initiator of autophagy, and this regulation results in decreased autophagic activity [96]. NDR2 also negatively regulates starvation-induced autophagy by promoting the TRIM27/ULK1 complex [38]. NDR2 serves as a scaffold protein, enabling the binding of TRIM27 (tripartite motif-containing 27), an E3 ubiquitin ligase to ULK1. The subsequent destruction of ULK1 by NDR2 abolishes ULK1-induced autophagy, which in turn promotes tumorigenesis in human breast cancer [38]. TRIM27 also catalyzes NDR2 ubiquitination at K73 and K119, leading to its subsequent activation [38]. Despite this, NDR2 expression does not correlates with OS in breast cancer patients according to the HAP database (Supplemental Fig. 2).

In neurons, NDR2 maintains homeostasis by regulating the trafficking of ATG9A-positive vesicles, which are essential for autophagy. ATG9A is located in the trans-golgi network and endosomes [81]. During autophagy, ATG9A-positive vesicles interact with phagophores, promoting their expansion [97,98]. While the precise role of NDR2 and ATG9A in autophagosome formation remains unclear, there is a possibility of a direct interaction between the two, as ATG9A contains a consensus motif for phosphorylation by NDR2 ($^{199}$HKRELpT$^{204}$) that can be phosphorylated by NDR2. Thus, NDR2 could either activate ATG9A through phosphorylation or facilitate the transport of ATG9A-positive vesicles along the cytoskeleton to fuse with phagophores. This mechanism is currently under investigation.

In neurons lacking NDR1/2, the formation of autophagosomes is reduced, leading to reduced autophagy efficiency, which in turn leads to p62 accumulation and subsequent neurotoxicity [81]. AS-IV (astragaloside IV, an active ingredient of Jinfukang Oral Liquid, a clinical combination anticancer drug approved by the National Food and Drug Administration (FDA) of China), potentiates the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of bevacizumab on NSCLC. The mechanism underlying these effects involves inhibition of the autophagy pathway via the targeting de-SUMOylation of NDR2, thereby increasing its activity [35,99].

### 3.8. NDR2 in ciliogenesis

NDR2 participates in vesicles trafficking necessary for ciliogenesis. NDR2 phosphorylates Rabin 8 [100], a key player in the early stages of ciliogenesis [101,102]. This phosphorylation activates the exocyst complex, which is essential for the attachment and docking of vesicles to the plasma membrane at the centrosome [103,104]. This process is vital for the attachment and fusion of vesicles during cilium formation [100]. Notably, NDR2 is present on the surface of peroxisomes at the centrosome, which is required for the formation of primary cilia [105]. Interestingly, NDR2, but not NDR1, is involved in this primary cilium formation, likely due to their distinct subcellular localizations [100,105]. This difference can be attributed to the presence of a peroxisome-targeting signal type-1 (PTS1), a typical motif (Gly-Lys-Leu, or GKL) at the C-terminal end of NDR2 [106]. In contrast, NDR1 carries an Ala-Lys sequence at the same position (Supplemental Fig. 1) which likely contributes to their different roles in ciliogenesis.

NDR2 is also identified as the causal gene for canine early retinal degeneration, the genetic disorder corresponding to the human ciliopathy [107–109]. A mutation removes exon 4 from the canine STK38L/NDR2 gene, resulting in the loss of most of the N terminus of the translated protein. This results in the loss of binding sites for S100B and Mob proteins, part of the protein kinase domain, and a T75 residue critical for autophosphorylation [107].

### 3.9. NDR2 in immune response - inflammation

Like MST1/2 (other Hippo kinases) and NDR1 (its counterpart), NDR2 regulates immunity [110–113]. Additionally, upregulated genes in NDR2 KO retinas highlight its potential involvement in oxidative, mitochondrial stress and inflammation [109]. Both NDR2 and NDR1 prevent the excessive production of inflammatory cytokines by inhibiting the TLR9-mediated innate immune response [111,112]. In the absence of NDR2, the expression of IL-17 induced cytokines (IL-6, CXLC20, CCL20), highlighting NDR2's role in cytokine regulation [40].

During infection with a RIG-I-sensitive RNA virus, NDR2 controls the production of interferons (IFNs) and pro-inflammatory cytokines. NDR2 also enables full activation of RIG-I by serving as a scaffold protein between RIG-I and TRIM25, a polyubiquitin [111,114]. This complex is crucial for proper polyubiquitination of RIG-I, which is necessary for its activation and antiviral immune response [114,115]. In HIV-1 infection, NDR2 is cleaved at the C-terminal position (F438) by the HIV protease, producing a truncated NDR2 that translocate to the nucleus. However,

truncation of NDR2 (or NDR1 at F440) does not interfere with its association with Mob2 or its autophosphorylation activity, but alters its enzymatic activity or substrate specificity [116]. If HIV protease-mediated truncation also affects NDR1, the functional consequences may be different because NDR1 is mainly nuclear whereas NDR2 is typically cytoplasmic [11] (see section 2.3). Thus, a change in the NDR2 localization could provide it with new substrates and new functions [116].

NDR1/2 are required for thymic immunity, particularly in the exit and migration of naive T lymphocytes from the thymus following maturation. In mice with T-cell-specific NDR1/2 KO, a 60 % reduction in peripheral T cells occurs [117]. Upon T-cell receptor (TCR) stimulation, NDR2 is activated and phosphorylates filamin A (FLNa), leading to activation of the integrin LFA-1. This activation is necessary for the proper T lymphocyte response. NDR2 enables LFA-1 to undergo a conformational change, increasing its affinity for its ligand [118]. Specifically, NDR2 phosphorylates FLNa at serine 2152 (in a non-consensus phosphorylation site RxRxxS instead of the usual HxRxxS), promoting the dissociation of FLNa from LFA-1 and stabilizing the open conformation of LFA-1 in T Cells [118].

In T-cells, loss of NDR1/2 is linked to lymphoma development [61,114,115]. Reduced NDR1 levels lead to a defective response to pro-apoptotic signals, promoting cancer cell survival and facilitating tumor development in mice. In this scenario, NDR1 acts as tumor suppressors [61]. Furthermore, in mice with Dalton's lymphoma, decreased NDR2 protein levels in the spleen are associated with enhanced tumor cell proliferation [115].

## 4. Contribution of Proteomics to Identifying Specific NDR2 Partners and Substrates

The aim of this study was to identify common interaction partners for NDR2 and NDR1 in healthy, non-metastatic, and metastatic human lung cancer cells, as well as to identify NDR2-specific interactors and their potential cellular functions. To achieve this, a co-immunoprecipitation approach was utilized, employing IgG, NDR1-coupled IgG, or NDR2-coupled IgG on three distinct whole cell extracts. These included one from non-tumoral human lung epithelial cells (HBEC-3) and two from lung adenocarcinoma cells, one from primitive (H2030) and the other from brain metastasis (H2030-BrM3). LC-MS quantitative DIA Label-Free analysis was performed using biological triplicates for each condition. Differential proteins were identified through enrichment analysis based on linear models and empirical Bayes statistics. The statistical criteria used for this analysis included a 1.2-fold change threshold and a *p*-value cut-off of >0.05. The STRING database was employed to explore the direct and indirect correlations between known and predicted protein–protein interactions. The NDR2 interactome was clustered based on enrichment in the Reactome, pathway, and molecular function databases, as well as the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, https://www.genome.jp/kegg/) (Supplemental Fig. 3).

### 4.1. Interactome of NDR2 from HBEC-3 cell extract (Fig. 5)

In the HBEC-3 extract, which is derived from an hTERT-immortalized epithelial cell isolated from the bronchus of a 65-year-old female patient, 40 proteins were specifically co-immunoprecipitated by the anti-NDR1 antibody, while 73 proteins were co-immunoprecipitated by the anti-NDR2 antibody. Among these proteins, 11 interact with both NDR1 and NDR2 (Fig. 5A, Supplemental Table 1). Notable examples include the regulator of CDKN1A expression (NLE1), the transmembrane protein 150C (a non-selective cation channel with high permeability to Ca2+) or the cytoplasmic Malate dehydrogenase (MDH1). A total of 62 proteins has physical interactions exclusively with the NDR2 kinase. Using natural MCL clustering (inflation parameter = 3), distinct clusters were identified based on biological processes, as classified by Gene Ontology (Fig. 5B and C).

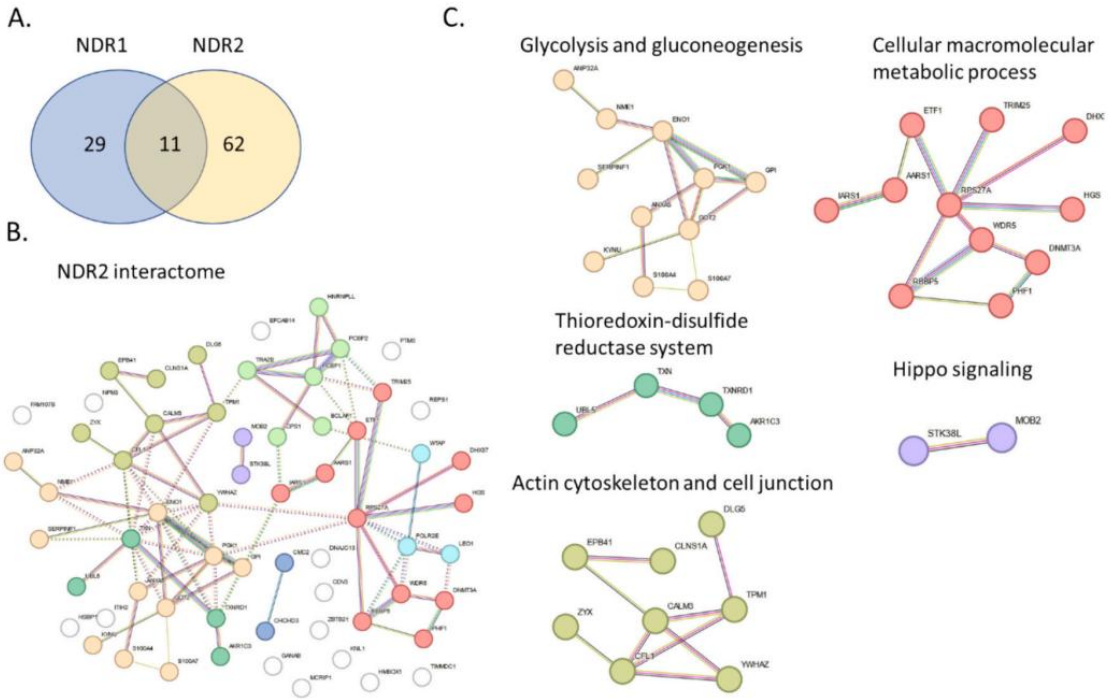



**Fig. 5.** Interactome of NDR2 from HBEC cell extract. A. A Venn diagram illustrating the number of proteins specifically co-immunoprecipitated by the anti-NDR1 antibody, the anti-NDR2 antibody, or both. B. The NDR2-specific interactome generated using the STRING website (https://string-db.org/), displaying functional protein association networks. C. Clustering of the NDR2 interactome was performed using natural MCL clustering (inflation parameter = 3), resulting in distinct clusters based on biological processes (Gene Ontology), as well as enrichment from reactome, pathway, and molecular function databases.

#### 4.1.1. Glycolysis, gluconeogenesis and Ca2+ homeostasis

One cluster consists of enzymes involved in glycolysis and gluconeogenesis, including Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1), Alpha-enolase (ENO1), Glucose-6-phosphate isomerase (GPI), and Aspartate aminotransferase (GOT2) [119–122]. Metabolic reprogramming (MR), a hallmark of cancer, supports the survival and proliferation of malignant cells and is linked to the Hippo pathway, including the onco-suppressive kinase cascade and YAP-1/TAZ effectors [123–126]. This cluster also includes two S100A proteins (S100A4 and S100A7), which regulate calcium homeostasis and influence energy metabolism, motility, angiogenesis, differentiation, apoptosis, and autophagy [127–130]. Overexpression of S100A4 or S100A7 is associated with poor prognosis and metastasis in cancers, including NSCLC [131–134]. In breast cancer, S100A7 enhances aggressiveness by interacting with c-Jun activation domain-binding protein 1 and HIF-1 transcription factors [135]. Hypoxia-induced NDR2 overactivation contributes to brain metastasis in NSCLC through a c-Jun-dependent mechanism [15], suggesting S100A proteins may play a role in NDR2-driven metastasis.

#### 4.1.2. Thioredoxin-disulfide reductase system

Thioredoxin (TXN), thioredoxin reductase 1 (TXNRD1), and aldo-keto reductase (AKR1C3) are part of the thioredoxin disulfide reductase (TRX) system, a key antioxidant defense against oxidative stress. This system regulates cell proliferation, angiogenesis, apoptosis, and senescence [120,136,137]. The Hippo pathway [138,139] and hypoxia [140] are sensitive to the redox environment. For example, the TRX system is required for the antiapoptotic effect of YAP-1 in insulin-producing β-cells [141]. In human melanoma cells, LATS1, another NDR kinase, regulates ROS, with increased oxidative stress observed after LATS1 KO [142]. In addition, exposure to H2O2 can induce phosphorylation of MST1/2, Mob, and LATS1 [143]. As the TRX system emerges as a potential cancer therapy target [137], core Hippo kinases like NDR2 may also be considered.

Ubiquitin-like protein 5 (UBL5) is an atypical ubiquitin-like protein that regulates stress responses and protein targeting to mitochondria or pre-mRNA splicing but lacks the carboxy-terminal motif needed for degradation [144,145]. Knockdown of UBL5 induces severe apoptosis in culture and suppresses tumorigenicity of cancer cells in vivo [145]. The involvement of UBL5 in the mechanisms of carcinogenesis [146] and its cellular localization in both in cytoplasm and nucleus [145] suggest UBL5 as a potential partner for NDR2.

#### 4.1.3. Actin cytoskeleton and cell junction system

This cluster contains protein regulating cell morphology and cytoskeletal organization Cofilin-1 (CFL1) or Zyxin (ZYX) and two adapters protein DLG5 and YWHAZ (Fig. 5C). Cofilin, is an actin-modulating protein that binds and depolymerizes filamentous F-actin and inhibits polymerization of monomeric G-actin [147]. LIM kinase and Ca/calmodulin-dependent protein kinases II (CaMKII) phosphorylate and inactivate cofilin at S3 [148,149], while PKCα at S23 and/or S24 [150]. Phosphorylated cofilin failed to manipulate F-actin polymerization and lamellipodium formation, impairing migration [151]. LATS1 can directly interact with LIMK1 to inactivate cofilin, independent of LATS1 kinase activity. This negative regulation of LATS1 on LIMK1 controls F-actin level specifically at the contractile ring and the periphery of cells for the proper progression of cytokinesis [152]. In mouse fibroblasts, the Hpo orthologs MST1 and MST2 colocalize with F-actin structures and are activated upon F-actin depolymerization. The authors suggest, that by tethering components of the Hippo pathway, F-actin dynamics modulate their activity [153]. Indeed, Cofilin is the terminal effector of Rho GTPase signaling, which is a major pathway of the actin cytoskeleton dynamics and can promote the cancer metastasis by regulating EMT. Mechanism which is can by reverted in HBEC cells by NDR2 depletion [14,15,72]. Cofilin is significantly increased in various tumors [154], including NSCLC [155].

Zyxin is a member of the cell–cell adhesion complex and controls cell cytoskeleton and motility and thus linked with a number of cancers such as melanoma, hepatocellular carcinoma, oral squamous-cell carcinoma [156]. Zyxin is phosphorylated by CDK1 during mitosis, then activated Zyxin regulates YAP activity and promotes cell growth [157]. In response to hypoxia and TGF-β stimuli, Zyxin via its LIM domain, can act as a scaffold protein to forms a ternary complex with LATS2 and SIAH2. This interaction facilitates LATS2 ubiquitination and degradation, YAP dephosphorylation and subsequent activation. Thus Zyxin may function as a negative regulator of Hippo signaling through controlling LATS2 stability and YAP activity in human breast cancer [158]. However, a decreased expression of Zyxin has been shown in NSCLC which may indicate a suppressor role of this protein in NSCLC [159]. Thus, by regulating Hippo kinase Zyxin may play an important role in tumorigenesis.

The membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) protein discs large homolog 5 (DLG5) is a multifunctional adaptor and scaffolding protein containing four PDZ domains [160]. DLG5 is involved in both epithelial cell structuring, adherents junction formation, and intracellular signaling [161] and can connect cell polarity and Hippo signaling protein networks [162]. DLG5 inhibits MST1/2-mediated phosphorylation of LATS1 by promoting recruitment of the Par-1 polarity proteins microtubule affinity-regulating kinases 3 (MARK3) to MST1/2 [162,163]. Thus, loss of DLG5 promotes breast cancer malignancy by inhibiting the Hippo pathway [163]. In NSCLC, resistance to chemotherapy is associated with increased DLG5 expression [164]. In squamous cell lung cancer, DLG5 expression is downregulated in patient tissue samples and is associated with EMT biomarkers [165]. Thus, DLG5 controls cell proliferation, EMT, cell migration and invasion, epithelial cell polarity and acts as a regulator of the Hippo signaling pathway [162], a set of roles that DLG5 shares with NDR2. Whether, DLG5 binds directly to MST1/2 through its third PDZ domain, DLG5 sequence also contains three consensus phosphorylation sites for NDR kinases (HxRxxS/T) at start positions 235-HSRLLS, 1442-HSRSSS and 1695-HKRSGS and thus emerge as a potential substrate of NDR1/2 kinases. In hepatocellular carcinoma cell models, DLG5 undergoes continuous ubiquitination and proteasome degradation in a phospho-S730-dependent manner [161]. This suggests that, as already proposed in Drosophila, the Hippo pathway may reciprocally modulate the scaffolding function of DLG5 in the control of growth, cell polarity and cell adhesion [166].

This cluster also includes the YWHAZ protein (14–3-3 protein zeta/delta), an adaptor protein able to bind to number of enzymes, signaling proteins, and transcription factors. YWHAZ regulates a broad spectrum of signaling pathways by binding to the phosphorylated transcription factor TFEB and promoting its cytosolic retention and inactivation [167]. TFEB acts as a master regulator of lysosomal biogenesis, autophagy, lysosomal exocytosis, lipid catabolism, energy metabolism and immune response by regulating the expression of multiple genes in the Coordinated Lysosomal Expression and Regulation (CLEAR) network [168]. YAP-1 interacted with TFEB [169] which is consistent with importance of the Hippo pathway in the regulation of cellular trafficking and autophagy [84]. A mechanism similar to LATS/NDR phosphorylation of YAP-1/TAZ, whereby YAP-1 is recruited by 14–3-3, to the cytoplasm, resulting in the termination of TEAD-dependent gene transcription [5].

#### 4.1.4. Hippo pathway

Only the Hippo pathway protein, MOB2A, is found in NDR2 interactome, suggesting a specific association between MOB2 and NDR2 in HBEC cells, whose inhibitory role on NDR kinases is described by competes with MOB1A for NDR binding and activation [11,23,170].

#### 4.1.5. Cellular macromolecule metabolic process

A cluster of 11 proteins annotated in cellular macromolecule metabolism process is identified. These proteins are chromatin regulators (PHF1, DNMT3A, RBBP5 and WDR5), involved in prevention of

phagosomal-lysosomal fusion (RPS27A, HGS) or in protein biosynthesis (Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (ETF1), Alanine-tRNA ligase (AARS1) or Isoleucine–tRNA ligase (IARS1). Nine of these are post-translationally modified by the attachment of at least one ubiquitin-like modifier protein, a mechanism known to enhance NDR2 kinase activity [35]. Additionally, AARS1 functions as a lactate sensor that mediates global lysine acylation (called lactylation) of protein such as p53 in tumor cells [171,172]. AARS1 uses lactate and ATP to catalyze protein lactylation on TEAD and YAP-1 which promotes expression of Hippo pathway target genes in gastric cancer [173].

Although not included in a specific cluster, the Receptor-mediated endocytosis 8 (RME-8)/DNAJC13 protein (*DNAJC13*) is retained by beads coupled to the anti-NDR2 antibody. RME-8 is a positive modulator of autophagy that stabilizes cellular protein homeostasis by interfering with ATG9A trafficking [174]. RME-8 is involved in membrane trafficking through early endosomes, early endosome-to-recycling endosome or early endosome-to-late endosome transport. It has also been implicated in transferrin recycling and epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor (EGFR) degradation [175,176].

### 4.2. Interactome of NDR2 from H2030 cell extract

H2030 cells (CRL-5914™, ATCC) were isolated in 1988 from the lungs of a non-smoking man with NSCLC and exhibited epithelial morphology. In H2030 cell lysate, 41 proteins were retained by the anti-NDR2 antibody, but 19 of these were also retained by the anti-NDR1 antibody (Fig. 6A, Supplemental Table 1). Among them, only ABLIM3 has a consensus NDR kinase phosphorylation site (HxRxxS/T) at position 47-HIRCFT and 337-HSRYMS respectively. ABLIM3, is a member of the actin-binding LIM (abLIM) protein family, a component of the junctional complex. ABLIM3 plays a role in embryonic development, cell lineage determination and cancer progression [177] and neuroblastoma metastasis via regulating of the cell adhesion molecule pathway [178]. The small number of proteins identified in the NDR2 interactome limits the identification of functional clustering. Only 3 enrichments based on reactome pathways were found (Fig. 6B).

#### 4.2.1. p53 signaling pathway

Cytochrome c (CYCS) is a central figure in the activation of the intrinsic apoptotic pathway, mediating the allosteric activation of apoptosis-protease activating factor 1 (Apaf-1), which is required for the proteolytic maturation of caspase-9 and caspase-3 [179]. Hippo pathway is an inducers of apoptosis in response to wide range of stimuli [180]. The tumor suppressor *RASSF1* gene is an important determinant in mediating YAP-1 pro-apoptotic activities and the inactivation of RASSF1A in lung cancer cells induced NDR2 hyperactivation [14,72]. Furthermore, the LATS1/2 kinases and YAP-1 function in a complex network with p53 to regulate apoptosis [181].

Thrombospondin-1 (TSP1) is a multifunctional protein, involved in apoptosis, angiogenesis, senescence, metabolic homeostasis [182] and

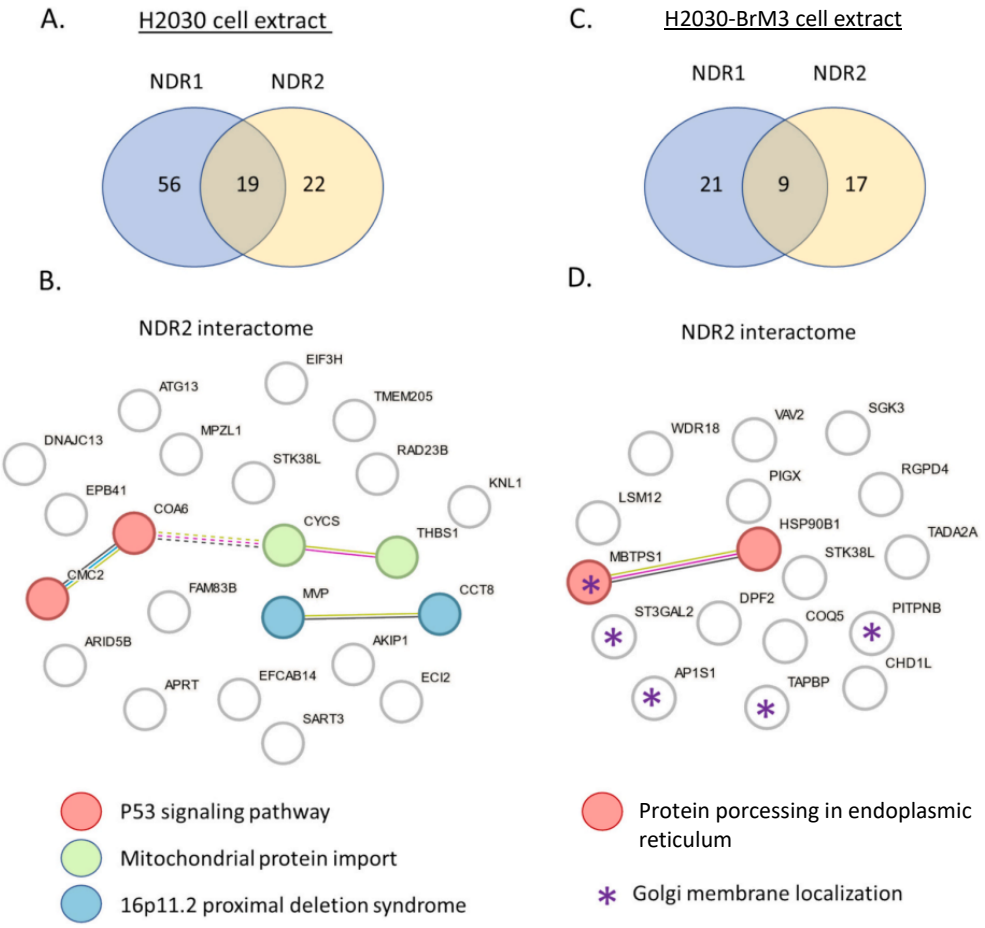



**Fig. 6.** Interactome of NDR2 from H2030 cell and H2030-BrM3 extracts. A and C. Venn diagram showing numbers of proteins specifically co-immunoprecipitated by the anti-NDR1 antibody, anti-NDR2 antibody or both from H2030 and H2030-BrM3 extracts respectively. B and D. NDR2 specific interactome generated by STRING's website (https://string-db.org/) showing functional protein association networks for in H2030 and H2030-BrM3 respectively. Clustering of the NDR2 interactome using natural MCL clustering (inflation parameter = 3), different clusters, based on biological process (Gene Ontology), enrichment of reactome, pathway, and molecular function databases.

in autophagy upon inhibition of the Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) inhibitor [183]. TSP1 dysregulates YAP-1 nuclear translocation during the initial phase of infection of cardiac endothelial cells by the parasite, *Trypanosoma cruzi* [184]. This nuclear translocation is dependent on YAP-1 phosphorylation by upstream LATS/NDR kinases [29]. In turn, YAP-1 transcriptionally activates TSP1/FAK signaling which promotes focal adhesion and tumor aggressiveness in breast cancer [185]. These findings suggest a potential crosstalk between Hippo pathway kinases, such as NDR2, and TSP1 in the context of invasiveness.

#### 4.2.2. Mitochondrial protein import

This cluster includes only the COX assembly mitochondrial protein 2 homolog (CMC2) and cytochrome *c* oxidase assembly factor 6 (COA6), which are involved in cytochrome *c* oxidase biogenesis and mitochondrial respiratory chain complex IV maturation, respectively [186]. COA6 regulates cell proliferation, apoptosis, migration, and invasion through modulation of oxidative phosphorylation in both breast cancer [187] and lung adenocarcinoma [188,189].

#### 4.2.3. 16p11.2 proximal deletion syndrome

Major vault protein (MVP), encoded by a gene located on chromosome 16 (16p11.2), is the major component of a ribonucleoprotein particle with a hollow barrel-like structure called the vaults complex. MVP plays a role in the inflammatory process **[190]** and in the chemo- **[191]** and radio-resistance **[192]** cancer cells. MVP is a nucleocytoplasmic transporter involved in major cytoplasmic signal transduction cascades through binding to various kinases (Erk, src) and phosphatases (PTEN, SH2-domain-containing tyrosine phosphatase SHP-2) **[192]**. The role of MVPs in human cancer remains unclear. In glioblastoma, vaults proteins have a tumor-promoting potential by stabilizing EGFR/PI3K-mediated migration and survival pathways [193]. In renal adenocarcinoma cells, a complex formation of vaults with HIF-1α, PHDs and pVHL is reported, suggesting that MVP/vault may act as scaffold protein for ubiquitination and degradation of HIF1α, thereby affecting hypoxia-regulated expression of HIF-1α-dependent genes **[194]**. In lung adenocarcinoma, the increased expression of MVP is associated with a better prognosis and thus, by inhibiting STAT3 pathway, MVP may act as a lung tumor suppressor **[195]** and is called lung resistance-related protein (LRP) **[196]**. Surprisingly, no published work other than the present review establishes a potential link between the Hippo pathway via NDR2 and MVP. However, MVP is regulated at the level of tyrosyl phosphorylation, in EGF-stimulated cells, tyrosine phosphorylation is required for MVP to reveal its scaffolding or direct regulatory function **[197]**.

T-complex protein 1 subunit theta (TCP-1-theta) (CCT8 on chromosome 21q21.3)) is highly expressed in most cancers with a poor prognosis **[198]**, including lung adenocarcinoma **[199]**. TCP-1-theta is a component of chaperonin-containing T-complex (CCT), a molecular chaperone complex that controls the folding of a variety of proteins associated with cell cycle regulation, chromatin remodeling, secretory pathways, phosphatase activity, and cytoskeletal function **[200]**. For example, CCT8 promotes the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by regulating the expression of α-actin and β-tubulin **[201]**.

#### 4.2.4. Potential NDR2 interactors not included in MCL clustering

The FAM83B protein, which possesses a consensus NDR kinase site (537-HSRLRS) appears specifically in NDR2 interactome. FAM83B is a putative proto-oncogene that functions in the EGFR signaling pathway. It activates EGFR itself as well as the downstream RAS/MAPK and PI3K/AKT/TOR signaling cascades to promote epithelial cell transformation and resistance to TKI therapies [202–205]. Additionally, variations in the expression levels of FAM83B influence the progression of autophagy in breast cancer cell lines [206]. In lung adenocarcinoma, FAM83B regulates mitochondrial metabolism and anti-apoptotic activity [207]. Indeed, a group of NSCLCs characterized by short disease-free survival (DFS) is enriched for FAM83B mutations [208]. FAM83A, another member of the FAMily with sequence similarity 83 (FAM83) protein family, regulates the Wnt and Hippo signaling pathways, which in turn promote lung cancer progression and a poor prognosis [209]. Consequently, both FAM83B and FAM83A are prognostic biomarkers and potential therapeutic targets in NSCLC [210,211].

Autophagy-related protein 13 (ATG13), a protein identified in the NDR2 interactome, plays a critical role in the initiation of autophagy. ATG13 participates in the phagophore assembly site, where autophagosomes are formed [212].

### 4.3. Interactome of NDR2 from H2030-BrM3 cell extract

H2030-BrM3 (generously provided by Dr. Joan Massagué (Cancer Biology and Genetics Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY) were isolated from brain metastases of H2030 lung adenocarcinoma cells harboring a $KRAS^{G12C}$ mutation. In H2030-BrM3 cell lysate, only 17 proteins were specifically retained by the Anti-NDR2 antibody and 9 by anti-NDR2 and anti-NDR1 antibodies (Supplemental Table 1). One enrichment was found based on subcellular localization in the Golgi membrane and one in the KEGG pathway related to protein processing in the endoplasmic reticulum, including MBTPS1 and HSP90B1 proteins (Fig. 6C and D).

#### 4.3.1. Golgi membrane localization

The AP-1 complex subunit sigma-1 A (Sigma1A-adaptin) (AP1S1) is a key component of Adaptor protein complex-1 (AP-1), which is crucial for intracellular protein trafficking. Its involved in the intracellular vesicle trafficking of membrane proteins, including receptors, from the trans-Golgi network (TGN) to endosomes, lysosomes or the plasma membrane [213,214]. Downregulation of AP1S1 causes the lysosomal degradation of EGFR in NSCLC by recycling ligand-stimulated EGFR back to the plasma membrane via RAB11-positive endosomes [215].

Membrane-bound transcription factor site-1 protease (MBTPS1) cleaves the pro-peptide from FAM20C, which is required for its release from the Golgi membrane and for the enhancement of FAM20C kinase activity [216]. FAM20C is a secretory kinase involved in the phosphorylation of numerous ECM-related secreted proteins. Increased secretion of FAM20C leads to extracellular matrix degradation and loss of vascular basement membrane integrity, thereby promoting tumor metastatic dissemination [217]. In the gingival fibrosis cells, FAM20C depletion activates the TGFβ-YAP-1/TAZ signaling pathway [218]. High expression or hypomethylation of *FAM20C* correlates with poor prognosis in hypoxia-associated lung adenocarcinoma [219]. Consistently, a decreased mRNA expression level of *MBTPS1* has also been shown in NSCLC [220]. Collectively, these data suggest that MBTPS1 and FAM20C may contribute to bronchial carcinogenesis and its metastatic progression in hypoxic tumors through the modulation of Hippo signaling, a hypothesis consistent with the observations reported for NDR2 in NSCLC [15].

Tapasin (TAPBP) belongs to the immunoglobulin superfamily and is found in the Golgi membrane protein cluster of the NDR2-specific interactome. TAPBP mediates the interaction between newly assembled major histocompatibility complex class 1 (MHC class I) and antigen processing-associated transporter (TAP). In NSCLC, increased *TAPBP* gene expression in peripheral blood is associated with improved disease-free survival and tapasin expression in tumor samples is positively correlated with improved OS [221,222]. Hippo pathway, via YAP-1/TEAD complex controls antitumor immunity by regulating the expression of MHC class I-mediated tumor antigen processing and presentation (APP) pathway genes, providing a rationale for inhibiting YAP activity in immunotherapy for cancer [223].

PITPNB, the phosphatidylinositol transfer protein beta isoform (PITPβ), is required for retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum [224]. PITPα/β can affect the Hippo pathway by regulating LATS and YAP-1 via plasma membrane phosphatidylinositol-

4-phosphate [225]. The signaling connection between the Hippo and phosphoinositide pathways controls the transcriptional activation of YAP-1 [226]. PITPα/β are highly expressed in tumor tissues and are associated with a poor prognosis in gastric cancer [227]. Microcolin H, a naturally occurring marine lipopeptide, directly binds PITPα/β and shows antiproliferative activity on several types of tumor cell lines. Guan et al. reported microcolin as an inhibitor targeting PITPα/β to activate the Hippo/YAP pathway and suppress the proliferation of YAP-dependent tumor cells [225]. Additionally, treatment with microcolin H increases the conversion of LC3I to LC3II, accompanied by a reduction in p62 levels in cancer cells, leading to autophagic cell death [227]. These data provide further evidence that NDR2 may be involved in the overall mechanism for the regulation of autophagy.

## 5. NDR2 as a therapeutic target: Current status and future perspectives

Researchers are continually exploring methods to advance personalized and precision medicine, notably by deploying conventional pharmacological approaches as well as innovative strategies such as RNAi therapy and gene editing [228,229]. These strategies are summarized in many comprehensive reviews [228,230–237]. In the following sections, we will focus on Hippo kinases including NDR2-based strategies.

### 5.1. Hippo pathway core kinases in cancer treatment

Numerous preclinical and clinical (phase 1) trials targeting Hippo pathways have been conducted, but no drug has been developed for clinical use [238,239]. These preclinical and clinical trials mainly target YAP-1/TAZ expression/activity (such as EZH2 inhibitors or Fingolimod for the treatment of hepatocellular carcinoma [240]) or the YAP-TEAD interaction. Another therapeutic strategy is to inhibit Hippo core kinase, such as MSTs kinase [241] or LATSs [242], to control YAP-1/TAZ nuclear or cytoplasmic location and subsequently their co-transcriptional capabilities [238]. In a recent study, an MST1/2 inhibitor, utilizing a neratinib backbone, which is a clinically approved, epidermal growth factor receptor (EGFR)/EGFR2 inhibitor identified to have also high MST1 inhibitory activity, was applied in preclinical models of murine partial hepatectomy and demonstrated an accelerated liver regeneration with improved survival in models of steatohepatitis [243]. Even with prolonged dosing, no adverse effects on liver function or evidence of carcinogenesis were observed [243]. Liver regeneration is also induced by siRNA-mediated knockdown of MST1/2 in partial hepatectomy mouse models [244]. However, to our knowledge, these strategies have not yet led to drug development.

### 5.2. NDR2 as target in cancer therapy

#### 5.2.1. Targeting the NDR2 kinase or its substrates through conventional pharmaceutical inhibitors

No drug has been developed for clinical use that specifically targets the NDR2 kinase. The main reason for this absence may be its potential off-target activity. NDR2 kinase shares up to 90 % sequence similarity with NDR1 and the LATS1/2 kinases, particularly in its active and ATP-binding sites [20]. Therefore, developing a pharmacological inhibitor that can selectively target NDR2 activity without affecting other related kinases is challenging but vital since NDR2 has oncogenic properties, while NDR1, LATS1, and LATS2 are tumor suppressors in lung cancer cells [15,245].

Comparing the NDR1 and NDR2 interactome revealed new partners potentially able to modulate NDR2 activity and/or bioavailability, as well as new specific substrates of NDR2. Many of these proteins participate in well-characterized cellular processes. The consequences of disrupting these potential NDR2 interactors have already been studied, particularly on the progression and metastasis of several types of cancer. Potential therapeutic targets may emerge from the NDR2 interactome however, to date, no pharmaceutical molecule can stop the deregulation of an NDR2 substrate that supports carcinogenic processes. Studies remain necessary to identify the key substrates and then to develop inhibitors of these candidates.

#### 5.2.2. Targeting the NDR2 expression in cancer cells

We demonstrated using epigenetic approach, shRNA-transformed cells or direct siRNA silencing, the pro-metastatic nature of NDR2 in vitro in lung cancer cells and in vivo in mice models [14,15]. Due to their requirement for 100 % complementarity to their target, necessary for stable pairing and subsequent degradation, siRNAs exhibit a high degree of specificity [246,247]. Therefore, NDR2 siRNA silences NDR2 expression but not NDR1 expression [15]. A therapeutic approach using nanoparticle-encapsulated therapeutic RNA to target and silence NDR2 mRNA expression could therefore be expected. Although previous technical limitations have hindered the use of therapeutic siRNAs, recent advances in chemical modifications [248] have enhanced their efficiency and stability [249], reducing the amount required to effectively target a gene [250], and increasing their intracellular persistence [251]. Delivery remains a critical challenge in gene silencing, but nanoparticles (NPs) have emerged as promising candidates. Conventional lipid nanoparticles, such as liposomes, emulsions, and micelles, are commonly used to deliver pharmaceutical agents and nucleic acids (e.g., mRNA) into tumor tissues. However, these NPs have low loading capacities (<5 % by weight), limiting their broader clinical use [252,253]. Zeolite nanoparticles, in contrast, efficiently transport siRNAs, protect them from degradation, and enable effective drug delivery to target cells, offering better safety than viral vector-based systems [254]. Additionally, zeolites are highly stable [255,256] and their composition can be modulated as needed [257], making them NPs to be considered in future developments aimed at delivering therapeutic RNAs.

## 6. Conclusion

This review highlights the structural differences between NDR1 and NDR2, correlating them with the specific post-translational regulation of NDR2, to provide an overview of the biological processes and functions uniquely associated with NDR2. While the exact mechanisms remain incompletely understood, substantial evidence suggests that NDR2 plays a role in key biological processes, including proliferation, apoptosis, migration, invasion, vesicular trafficking, and autophagy. Additionally, specific NDR2 substrates, protein interactions, and functions have been identified in cellular models representing various stages of cancer, both before and after oncogenic transformation. Although functional interactions between NDR2 and these substrates/partners need further validation, they present new avenues for exploration to better understand the kinase's role. Identifying the partners, mechanisms, and cellular processes dependent on NDR2 in both physiological and pathological contexts, including cancer, is critical. Targeting of NDR2 by therapeutic RNA may prevent cancer spread and improve patient prognosis in cancers with NDR2 overexpression. Thus, NDR2 and its partners offer promising prospects for cancer therapy.

## CRediT authorship contribution statement

**Tiphaine Biojout:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Methodology, Formal analysis, Conceptualization. **Emmanuel Bergot:** Writing – review & editing, Funding acquisition. **Benoit Bernay:** Validation, Formal analysis, Data curation. **Guénaëlle Levallet:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Jérôme Levallet:** Writing – review & editing, Writing – original draft, Validation, Supervision, Project administration,

Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

### Patient consent for publication

Not applicable.

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

### Funding sources

Tiphaine Biojout benefits from a doctoral grant from the Région Normandie (RIN 100 % PhD student, 2022). Research grants were provided from the Association des Insuffisants respiratoires (AIR partenaires Santé) to G. Levallet (2020). This research was also funded by the Association pour le Développement de la Pneumologie (ADP, Pr Bergot), the Université Caen-Normandie (UNICAEN) and the Centre Hospitalier Universitaire de Caen Normandie.

### Declaration of competing interest

The authors declare no competing interests.

### Acknowledgements

The authors thank the University Hospital of Caen for its support. The authors are also grateful to the Proteogen facilities, US EMerode, University of Caen Normandie, Caen, France. We would also like to thank Dr. Laurent Chatre (CNRS, ISTCT) for his helpful discussions and guidance on the transcriptomic approach.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143656.

### Data availability

For all original proteomic data, please contact Dr. Jérôme Levallet (jerome.levallet@unicaen.fr).

### References

[1] L.H. Johnston, S.L. Eberly, J.W. Chapman, H. Araki, A. Sugino, The product of the Saccharomyces cerevisiae cell cycle gene DBF2 has homology with protein kinases and is periodically expressed in the cell cycle, Mol. Cell. Biol. 10 (1990) 1358–1366, https://doi.org/10.1128/MCB.10.4.1358.
[2] O. Yarden, M. Plamann, D.J. Ebbole, C. Yanofsky, Cot-1, a gene required for hyphal elongation in Neurospora crassa, encodes a protein kinase, EMBO J. 11 (1992) 2159–2166, https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1992.tb05275.x.
[3] W. Geng, B. He, M. Wang, P.N. Adler, The *tricornered* gene, which is required for the integrity of epidermal cell extensions, encodes the Drosophila nuclear DBF2-related kinase, Genetics 156 (2000) 1817–1828, https://doi.org/10.1093/genetics/156.4.1817.
[4] T. Millward, P. Cron, B.A. Hemmings, Molecular cloning and characterization of a conserved nuclear serine(threonine) protein kinase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 5022–5026, https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.5022.
[5] A. Hergovich, Regulation and functions of mammalian LATS/NDR kinases: looking beyond canonical hippo signalling, Cell Biosci. 3 (2013) 32, https://doi.org/10.1186/2045-3701-3-32.
[6] A. Hergovich, The roles of NDR protein kinases in hippo Signalling, Genes 7 (2016) 21, https://doi.org/10.3390/genes7050021.
[7] H. Cornils, R.S. Kohler, A. Hergovich, B.A. Hemmings, Downstream of human NDR kinases: impacting on c-myc and p21 protein stability to control cell cycle progression, Cell Cycle 10 (2011) 1897–1904, https://doi.org/10.4161/cc.10.12.15826.
[8] A. Hergovich, B.A. Hemmings, Mammalian NDR/LATS protein kinases in hippo tumor suppressor signaling, BioFactors 35 (2009) 338–345, https://doi.org/10.1002/biof.47.
[9] P.F. Santos, B. Fazendeiro, F.C. Luca, A.F. Ambrósio, H. Léger, The NDR/LATS protein kinases in neurobiology: key regulators of cell proliferation, differentiation and migration in the ocular and central nervous system, Eur. J. Cell Biol. 102 (2023) 151333, https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2023.151333.
[10] A.A.D. Sharif, A. Hergovich, The NDR/LATS protein kinases in immunology and cancer biology, Semin. Cancer Biol. 48 (2018) 104–114, https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.04.010.
[11] E. Devroe, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, P.A. Silver, Human mob proteins regulate the NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases, J. Biol. Chem. 279 (2004) 24444–24451, https://doi.org/10.1074/jbc.M401999200.
[12] J. Yue, H. Sun, S. Liu, F. Yu, S. Wang, F. Wang, R. Shen, F. Zhu, L. Zhang, C. Shao, Downregulation of NDR 1 contributes to metastasis of prostate cancer cells via activating epithelial-mesenchymal transition, Cancer Med. 7 (2018) 3200–3212, https://doi.org/10.1002/cam4.1532.
[13] Y. Bai, X. Sui, Z. Xuan, Y. Du, M. Fu, Z. Zheng, K. Yang, C. Xu, Y. Liu, B. Liu, M. Zhong, Z. Zhang, J. Zheng, X. Hu, L. Zhang, H. Sun, C. Shao, Discovery of a small-molecule NDR1 agonist for prostate cancer therapy, Front. Pharmacol. 15 (2024) 1367358, https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1367358.
[14] M. Keller, F. Dubois, S. Teulier, A.P.J. Martin, J. Levallet, E. Maille, S. Brosseau, N. Elie, A. Hergovich, E. Bergot, J. Camonis, G. Zalcman, G. Levallet, NDR2 kinase contributes to cell invasion and cytokinesis defects induced by the inactivation of RASSF1A tumor-suppressor gene in lung cancer cells, J. Exp. Clin. Cancer Res. 38 (2019) 158, https://doi.org/10.1186/s13046-019-1145-8.
[15] J. Levallet, T. Biojout, C. Bazille, M. Douyère, F. Dubois, D.L. Ferreira, J. Taylor, S. Teulier, J. Toutain, N. Elie, M. Bernaudin, S. Valable, E. Bergot, G. Levallet, Hypoxia-induced activation of NDR2 underlies brain metastases from non-small cell lung Cancer, Cell Death Dis. 14 (2023) 823, https://doi.org/10.1038/s41419-023-06345-3.
[16] A. Hergovich, S. Lamla, E.A. Nigg, B.A. Hemmings, Centrosome-associated NDR kinase regulates centrosome duplication, Mol. Cell 25 (2007) 625–634, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.020.
[17] A. Hergovich, R.S. Kohler, D. Schmitz, A. Vichalkovski, H. Cornils, B. A. Hemmings, The MST1 and hMOB1 tumor suppressors control human centrosome duplication by regulating NDR kinase phosphorylation, Curr. Biol. 19 (2009) 1692–1702, https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.020.
[18] A. Hergovich, S.J. Bichsel, B.A. Hemmings, Human NDR kinases are rapidly activated by MOB proteins through recruitment to the plasma membrane and phosphorylation, Mol. Cell. Biol. 25 (2005) 8259–8272, https://doi.org/10.1128/MCB.25.18.8259-8272.2005.
[19] J.C. Duhart, L.A. Raftery, Mob family proteins: regulatory partners in hippo and hippo-like intracellular signaling pathways, Front. Cell Dev. Biol. 8 (2020) 161, https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00161.
[20] M.R. Stegert, R. Tamaskovic, S.J. Bichsel, A. Hergovich, B.A. Hemmings, Regulation of NDR2 protein kinase by multi-site phosphorylation and the S100B calcium-binding protein, J. Biol. Chem. 279 (2004) 23806–23812, https://doi.org/10.1074/jbc.M402472200.
[21] P. Ling, T.-J. Lu, C.-J. Yuan, M.-D. Lai, Biosignaling of mammalian Ste20-related kinases, Cell. Signal. 20 (2008) 1237–1247, https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.019.
[22] S.J. Bichsel, R. Tamaskovic, M.R. Stegert, B.A. Hemmings, Mechanism of activation of NDR (nuclear Dbf2-related) protein kinase by the hMOB1 protein, J. Biol. Chem. 279 (2004) 35228–35235, https://doi.org/10.1074/jbc.M404542200.
[23] R.S. Kohler, D. Schmitz, H. Cornils, B.A. Hemmings, A. Hergovich, Differential NDR/LATS interactions with the human MOB family reveal a negative role for human MOB2 in the regulation of human NDR kinases, Mol. Cell. Biol. 30 (2010) 4507–4520, https://doi.org/10.1128/MCB.00150-10.
[24] T.A. Millward, D. Hess, B.A. Hemmings, Ndr protein kinase is regulated by phosphorylation on two conserved sequence motifs, J. Biol. Chem. 274 (1999) 33847–33850, https://doi.org/10.1074/jbc.274.48.33847.
[25] S. Chiba, M. Ikeda, K. Katsunuma, K. Ohashi, K. Mizuno, MST2- and furry-mediated activation of NDR1 kinase is critical for precise alignment of mitotic chromosomes, Curr. Biol. 19 (2009) 675–681, https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.02.054.
[26] K. Irie, T. Nagai, K. Mizuno, Furry protein suppresses nuclear localization of yes-associated protein (YAP) by activating NDR kinase and binding to YAP, J. Biol. Chem. 295 (2020) 3017–3028, https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010783.
[27] R. Tamaskovic, S.J. Bichsel, B.A. Hemmings, NDR family of AGC kinases – essential regulators of the cell cycle and morphogenesis, FEBS Lett. 546 (2003) 73–80, https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00474-5.
[28] R. Tamaskovic, S.J. Bichsel, H. Rogniaux, M.R. Stegert, B.A. Hemmings, Mechanism of Ca2+−mediated regulation of NDR protein kinase through autophosphorylation and phosphorylation by an upstream kinase, J. Biol. Chem. 278 (2003) 6710–6718, https://doi.org/10.1074/jbc.M210590200.
[29] Z. Meng, T. Moroishi, K.-L. Guan, Mechanisms of hippo pathway regulation, Genes Dev. 30 (2016) 1–17, https://doi.org/10.1101/gad.274027.115.
[30] A. Suzuki, T. Ogura, H. Esumi, NDR2 acts as the upstream kinase of ARK5 during insulin-like growth Factor-1 signaling, J. Biol. Chem. 281 (2006) 13915–13921, https://doi.org/10.1074/jbc.M511354200.
[31] T. Fukasawa, A. Enomoto, A. Yoshizaki-Ogawa, S. Sato, K. Miyagawa, A. Yoshizaki, The role of mammalian STK38 in DNA damage response and targeting for radio-sensitization, Cancers 15 (2023) 2054, https://doi.org/10.3390/cancers15072054.
[32] T.A. Millward, Calcium regulation of Ndr protein kinase mediated by S100 calcium-binding proteins, EMBO J. 17 (1998) 5913–5922, https://doi.org/10.1093/emboj/17.20.5913.

[33] A. Enomoto, T. Fukasawa, H. Tsumoto, M. Karube, K. Nakagawa, A. Yoshizaki, S. Sato, Y. Miura, K. Miyagawa, Prevention of calpain-dependent degradation of STK38 by MEKK2-mediated phosphorylation, Sci. Rep. 9 (2019) 16010, https://doi.org/10.1038/s41598-019-52435-8.
[34] A. Enomoto, N. Kido, M. Ito, N. Takamatsu, K. Miyagawa, Serine-threonine kinase 38 is regulated by glycogen synthase Kinase-3 and modulates oxidative stress-induced cell death, Free Radic. Biol. Med. 52 (2012) 507–515, https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.006.
[35] Y. Cheng, W. Hou, H. Fang, Y. Yan, Y. Lu, T. Meng, C. Ma, Q. Liu, Z. Zhou, H. Li, H. Li, N. Xiao, SENP2-NDR2-p21 axis modulates lung cancer cell growth, Eur. J. Pharmacol. 978 (2024) 176761, https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176761.
[36] N. Xiao, H. Li, W. Yu, C. Gu, H. Fang, Y. Peng, H. Mao, Y. Fang, W. Ni, M. Yao, SUMO-specific protease 2 (SENP2) suppresses keratinocyte migration by targeting NDR1 for de-SUMOylation, FASEB J. 33 (2019) 163–174, https://doi.org/10.1096/fj.201800353R.
[37] Y. Tang, W. Yu, SIRT1 and p300/CBP regulate the reversible acetylation of serine-threonine kinase NDR2, Biochem. Biophys. Res. Commun. 518 (2019) 396–401, https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.069.
[38] Y. Yang, Y. Zhu, S. Zhou, P. Tang, R. Xu, Y. Zhang, D. Wei, J. Wen, R.F. Thorne, X. D. Zhang, J. Guan, L. Liu, M. Wu, S. Chen, TRIM27 cooperates with STK38L to inhibit ULK1-mediated autophagy and promote tumorigenesis, EMBO J. 41 (2022) e109777, https://doi.org/10.15252/embj.2021109777.
[39] N. Furth, Y. Aylon, The LATS1 and LATS2 tumor suppressors: beyond the hippo pathway, Cell Death Differ. 24 (2017) 1488–1501, https://doi.org/10.1038/cdd.2017.99.
[40] X. Ma, D. Wang, N. Li, P. Gao, M. Zhang, Y. Zhang, Hippo kinase NDR2 inhibits IL-17 signaling by promoting Smurf1-mediated MEKK2 ubiquitination and degradation, Mol. Immunol. 105 (2019) 131–136, https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.10.005.
[41] K. Rehberg, S. Kliche, D.A. Madencioglu, M. Thiere, B. Müller, B.M. Meineke, C. Freund, E. Budinger, O. Stork, The serine/threonine kinase Ndr2 controls integrin trafficking and integrin-dependent neurite growth, J. Neurosci. 34 (2014) 5342–5354, https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2728-13.2014.
[42] O. Stork, A. Zhdanov, A. Kudersky, T. Yoshikawa, K. Obata, H.-C. Pape, Neuronal functions of the novel serine/threonine kinase Ndr2, J. Biol. Chem. 279 (2004) 45773–45781, https://doi.org/10.1074/jbc.M403552200.
[43] K. Jonischkies, M. Del Angel, Y.E. Demiray, A. Loaiza Zambrano, O. Stork, The NDR family of kinases: essential regulators of aging, Front. Mol. Neurosci. 17 (2024) 1371086, https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1371086.
[44] Y. Wei, V.L.Z. Hui, Y. Chen, R. Han, X. Han, Y. Guo, YAP/TAZ: molecular pathway and disease therapy, MedComm 4 (2023) e340, https://doi.org/10.1002/mco2.340.
[45] S. Qie, J.A. Diehl, Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment, J. Mol. Med. 94 (2016) 1313–1326, https://doi.org/10.1007/s00109-016-1475-3.
[46] M.C. Casimiro, M. Velasco-Velázquez, C. Aguirre-Alvarado, R.G. Pestell, Overview of cyclins D1 function in cancer and the CDK inhibitor landscape: past and present, Expert Opin. Investig. Drugs 23 (2014) 295–304, https://doi.org/10.1517/13543784.2014.867017.
[47] P. Ramos-García, J. Gil-Montoya, C. Scully, A. Ayén, L. González-Ruiz, F. Navarro-Triviño, M. González-Moles, An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis, Oral Dis. 23 (2017) 897–912, https://doi.org/10.1111/odi.12620.
[48] D. Schmitz-Rohmer, S. Probst, Z.-Z. Yang, F. Laurent, M.B. Stadler, A. Zuniga, R. Zeller, D. Hynx, B.A. Hemmings, A. Hergovich, NDR kinases are essential for somitogenesis and cardiac looping during mouse embryonic development, PLoS One 10 (2015) e0136566, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136566.
[49] R. Yang, E. Kong, J. Jin, A. Hergovich, A.W. Püschel, Rassf5 and Ndr kinases act in a novel pathway regulating neuronal polarity through Par3 phosphorylation, J. Cell Sci. (2014) jcs.146696, https://doi.org/10.1242/jcs.146696.
[50] Y.E. Demiray, K. Rehberg, S. Kliche, O. Stork, Ndr2 kinase controls neurite outgrowth and dendritic branching through α1 integrin expression, Front. Mol. Neurosci. 11 (2018) 66, https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00066.
[51] S.K. Ultanir, N.T. Hertz, G. Li, W.-P. Ge, A.L. Burlingame, S.J. Pleasure, K. M. Shokat, L.Y. Jan, Y.-N. Jan, Chemical genetic identification of NDR1/2 kinase substrates AAK1 and Rabin8 uncovers their roles in dendrite Arborization and spine development, Neuron 73 (2012) 1127–1142, https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.01.019.
[52] J.A. Zallen, E.L. Peckol, D.M. Tobin, C.I. Bargmann, Neuronal cell shape and neurite initiation are regulated by the Ndr kinase SAX-1, a member of the Orb6/COT-1/warts serine/threonine kinase family, MBoC 11 (2000) 3177–3190, https://doi.org/10.1091/mbc.11.9.3177.
[53] C. Zhang, Z. He, Z. Tan, F. Tian, Silencing of dentate gyrus inhibits mossy fiber sprouting and prevents epileptogenesis through NDR2 kinase in pentylenetetrazole kindling rat model of TLE, PLoS One 18 (2023) e0284359, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0284359.
[54] D.A. Madencioglu, G. Çalışkan, P. Yuanxiang, K. Rehberg, Y.E. Demiray, E. Kul, A. Engler, H. Hayani, J.R. Bergado-Acosta, A. Kummer, I. Müller, I. Song, A. Dityatev, T. Kähne, M.R. Kreutz, O. Stork, Transgenic modeling of Ndr2 gene amplification reveals disturbance of hippocampus circuitry and function, iScience 24 (2021) 102868, https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102868.
[55] C. Chen, M. Rodriguez Pino, P.R. Haller, F. Verde, Conserved NDR/LATS kinase controls RAS GTPase activity to regulate cell growth and chronological lifespan, MBoC 30 (2019) 2598–2616, https://doi.org/10.1091/mbc.E19-03-0172.
[56] H. Cornils, R.S. Kohler, A. Hergovich, B.A. Hemmings, Human NDR kinases control $G_1$ /S cell cycle transition by directly regulating p21 stability, Mol. Cell. Biol. 31 (2011) 1382–1395, https://doi.org/10.1128/MCB.01216-10.
[57] Z. Du, X. Tong, X. Ye, Cyclin D1 promotes cell cycle progression through enhancing NDR1/2 kinase activity independent of cyclin-dependent kinase 4, J. Biol. Chem. 288 (2013) 26678–26687, https://doi.org/10.1074/jbc.M113.466433.
[58] T.J. Grant, A.K. Mehta, A. Gupta, A.A.D. Sharif, K.S. Arora, V. Deshpande, D. T. Ting, N. Bardeesy, N.J. Ganem, A. Hergovich, A. Singh, STK38L kinase ablation promotes loss of cell viability in a subset of KRAS-dependent pancreatic cancer cell lines, Oncotarget 8 (2017) 78556–78572, https://doi.org/10.18632/oncotarget.20833.
[59] J. Brace, J. Hsu, E.L. Weiss, Mitotic exit control of the *Saccharomyces cerevisiae* Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates daughter cell separation after cytokinesis, Mol. Cell. Biol. 31 (2011) 721–735, https://doi.org/10.1128/MCB.00403-10.
[60] A.P. Sagona, H. Stenmark, Cytokinesis and cancer, FEBS Lett. 584 (2010) 2652–2661, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.044.
[61] H. Chen, G. Chen, G. Li, S. Zhang, H. Chen, Y. Chen, D. Duggan, Z. Hu, J. Chen, Y. Zhao, Y. Zhao, H. Huang, S.L. Zheng, J.M. Trent, L. Yu, D. Jiang, Z. Mo, H. Wang, Y. Mou, T. Jiang, Y. Mao, J. Xu, D. Lu, Two novel genetic variants in the *STK38L* and *RAB27A* genes are associated with glioma susceptibility, Intl journal of, Cancer 145 (2019) 2372–2382, https://doi.org/10.1002/ijc.32179.
[62] Q.T. Ostrom, S.S. Francis, J.S. Barnholtz-Sloan, Epidemiology of brain and other CNS tumors, Curr. Neurol. Neurosci. Rep. 21 (2021) 68, https://doi.org/10.1007/s11910-021-01152-9.
[63] H. Cornils, M.R. Stegert, A. Hergovich, D. Hynx, D. Schmitz, S. Dirnhofer, B. A. Hemmings, Ablation of the kinase NDR1 predisposes mice to the development of T cell lymphoma, Sci. Signal. 3 (2010), https://doi.org/10.1126/scisignal.2000681.
[64] A. Vichalkovski, E. Gresko, H. Cornils, A. Hergovich, D. Schmitz, B.A. Hemmings, NDR kinase is activated by RASSF1A/MST1 in response to Fas receptor stimulation and promotes apoptosis, Curr. Biol. 18 (2008) 1889–1895, https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.10.060.
[65] Y. Zhou, Y. Adolfs, W.W.M.P. Pijnappel, S.J. Fuller, R.C. Van Der Schors, K.W. Li, P.H. Sugden, A.B. Smit, A. Hergovich, R.J. Pasterkamp, MICAL-1 is a negative regulator of MST-NDR kinase signaling and apoptosis, Mol. Cell. Biol. 31 (2011) 3603–3615, https://doi.org/10.1128/MCB.01389-10.
[66] J. Kondelin, K. Salokas, L. Saarinen, K. Ovaska, H. Rauanheimo, R. Plaketti, J. Hamberg, X. Liu, L. Yadav, A.E. Gylfe, T. Cajuso, U.A. Hänninen, K. Palin, H. Ristolainen, R. Katainen, E. Kaasinen, T. Tanskanen, M. Aavikko, M. Taipale, J. Taipale, L. Renkonen-Sinisalo, A. Lepistö, S. Koskensalo, J. Böhm, J. Mecklin, H. Ongen, E.T. Dermitzakis, O. Kilpivaara, P. Vahteristo, M. Turunen, S. Hautaniemi, S. Tuupanen, A. Karhu, N. Välimäki, M. Varjosalo, E. Pitkänen, L. A. Aaltonen, Comprehensive evaluation of coding region point mutations in microsatellite-unstable colorectal cancer, EMBO Mol. Med. 10 (2018) e8552, https://doi.org/10.15252/emmm.201708552.
[67] L. Zhang, F. Tang, L. Terracciano, D. Hynx, R. Kohler, S. Bichet, D. Hess, P. Cron, B.A. Hemmings, A. Hergovich, D. Schmitz-Rohmer, NDR functions as a physiological YAP1 kinase in the intestinal epithelium, Curr. Biol. 25 (2015) 296–305, https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.054.
[68] M. Kleemann, H. Schneider, K. Unger, J. Bereuther, S. Fischer, P. Sander, E. Marion Schneider, P. Fischer-Posovszky, C.U. Riedel, R. Handrick, K. Otte, Induction of apoptosis in ovarian cancer cells by miR-493-3p directly targeting AKT2, STK38L, HMGA2, ETS1 and E2F5, Cell. Mol. Life Sci. 76 (2019) 539–559, https://doi.org/10.1007/s00018-018-2958-x.
[69] M. Khandelwal, V. Anand, S. Appunni, A. Seth, P. Singh, S. Mathur, A. Sharma, RASSF1A–hippo pathway link in patients with urothelial carcinoma of bladder: plausible therapeutic target, Mol. Cell. Biochem. 464 (2020) 51–63, https://doi.org/10.1007/s11010-019-03648-y.
[70] B. Cinar, E. Alp, M. Al-Mathkour, A. Boston, A. Dwead, K. Khazaw, A. Gregory, The hippo pathway: an emerging role in urologic cancers, Am J Clin Exp Urol 9 (2021) 301–317.
[71] J.-Y. Liu, Y.-H. Li, H.-X. Lin, Y.-J. Liao, S.-J. Mai, Z.-W. Liu, Z.-L. Zhang, L.-J. Jiang, J.-X. Zhang, H.-F. Kung, Y.-X. Zeng, F.-J. Zhou, D. Xie, Overexpression of YAP 1 contributes to progressive features and poor prognosis of human urothelial carcinoma of the bladder, BMC Cancer 13 (2013) 349, https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-349.
[72] F. Dubois, M. Keller, O. Calvayrac, F. Soncin, L. Hoa, A. Hergovich, M.-C. Parrini, J. Mazières, M. Vaisse-Lesteven, J. Camonis, G. Levallet, G. Zalcman, RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non–Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway, Cancer Res. 76 (2016) 1627–1640, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1008.
[73] F. De Fraipont, G. Levallet, C. Creveuil, E. Bergot, M. Beau-Faller, M. Mounawar, N. Richard, M. Antoine, I. Rouquette, M.-C. Favrot, D. Debieuvre, D. Braun, V. Westeel, E. Quoix, E. Brambilla, P. Hainaut, D. Moro-Sibilot, F. Morin, B. Milleron, G. Zalcman, An apoptosis methylation prognostic signature for early lung Cancer in the IFCT-0002 trial, Clin. Cancer Res. 18 (2012) 2976–2986, https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2797.
[74] P.T. Caswell, J.C. Norman, Integrin trafficking and the control of cell migration, Traffic 7 (2006) 14–21, https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00362.x.
[75] M. Uhlén, L. Fagerberg, B.M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A.-K. Szigyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. Von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson,

M. Zwahlen, G. Von Heijne, J. Nielsen, F. Pontén, Tissue-based map of the human proteome, Science 347 (2015) 1260419, https://doi.org/10.1126/science.1260419.
[76] C.-W. Lin, Y.-L. Chang, Y.-C. Chang, J.-C. Lin, C.-C. Chen, S.-H. Pan, C.-T. Wu, H.-Y. Chen, S.-C. Yang, T.-M. Hong, P.-C. Yang, MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the hippo pathway and LZTS1, Nat. Commun. 4 (2013) 1877, https://doi.org/10.1038/ncomms2876.
[77] M. Antonietta De Matteis, A. Di Campli, A. Godi, The role of the phosphoinositides at the Golgi complex, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 1744 (2005) 396–405, https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.04.013.
[78] R. Prekeris, J. Klumperman, R.H. Scheller, A Rab11/Rip11 protein complex regulates apical membrane trafficking via recycling endosomes, Mol. Cell 6 (2000) 1437–1448, https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00140-4.
[79] P. De Graaf, W.T. Zwart, R.A.J. Van Dijken, M. Deneka, T.K.F. Schulz, N. Geijsen, P.J. Coffer, B.M. Gadella, A.J. Verkleij, P. Van Der Sluijs, P.M.P. Van Bergen En Henegouwen, Phosphatidylinositol 4-kinaseβ is critical for functional association of rab11 with the Golgi complex, MBoC 15 (2004) 2038–2047, https://doi.org/10.1091/mbc.e03-12-0862.
[80] J.E. Burke, A.J. Inglis, O. Perisic, G.R. Masson, S.H. McLaughlin, F. Rutaganira, K. M. Shokat, R.L. Williams, Structures of PI4KIIIβ complexes show simultaneous recruitment of Rab11 and its effectors, Science 344 (2014) 1035–1038, https://doi.org/10.1126/science.1253397.
[81] F. Roşianu, S.R. Mihaylov, N. Eder, A. Martiniuc, S. Claxton, H.R. Flynn, S. Jalal, M.-C. Domart, L. Collinson, M. Skehel, A.P. Snijders, M. Krause, S.A. Tooze, S. K. Ultanir, Loss of NDR1/2 kinases impairs endomembrane trafficking and autophagy leading to neurodegeneration, Life Sci. Alliance 6 (2023) e202201712, https://doi.org/10.26508/lsa.202201712.
[82] D. Wang, J. He, B. Huang, S. Liu, H. Zhu, T. Xu, Emerging role of the hippo pathway in autophagy, Cell Death Dis. 11 (2020) 880, https://doi.org/10.1038/s41419-020-03069-6.
[83] M. Pavel, S.J. Park, R.A. Frake, S.M. Son, M.M. Manni, C.F. Bento, M. Renna, T. Ricketts, F.M. Menzies, R. Tanasa, D.C. Rubinsztein, A-Catenin levels determine direction of YAP/TAZ response to autophagy perturbation, Nat. Commun. 12 (2021) 1703, https://doi.org/10.1038/s41467-021-21882-1.
[84] Y. Maejima, D. Zablocki, J. Nah, J. Sadoshima, The role of the hippo pathway in autophagy in the heart, Cardiovasc. Res. 118 (2023) 3320–3330, https://doi.org/10.1093/cvr/cvac014.
[85] Y. Xiang, P. Peng, X. Liu, X. Jin, J. Shen, T. Zhang, L. Zhang, F. Wan, Y. Ren, Q. Yu, H. Zhao, Y. Si, Y. Liu, Paris saponin VII, a hippo pathway activator, induces autophagy and exhibits therapeutic potential against human breast cancer cells, Acta Pharmacol. Sin. 43 (2022) 1568–1580, https://doi.org/10.1038/s41401-021-00755-9.
[86] F. Tang, G. Christofori, The cross-talk between the hippo signaling pathway and autophagy:implications on physiology and cancer, Cell Cycle 19 (2020) 2563–2572, https://doi.org/10.1080/15384101.2020.1806450.
[87] C.W. Yun, S.H. Lee, The roles of autophagy in Cancer, IJMS 19 (2018) 3466, https://doi.org/10.3390/ijms19113466.
[88] W. Gan, X. Dai, X. Dai, J. Xie, S. Yin, J. Zhu, C. Wang, Y. Liu, J. Guo, M. Wang, J. Liu, J. Hu, R.J. Quinton, N.J. Ganem, P. Liu, J.M. Asara, P.P. Pandolfi, Y. Yang, Z. He, G. Gao, W. Wei, LATS suppresses mTORC1 activity to directly coordinate hippo and mTORC1 pathways in growth control, Nat. Cell Biol. 22 (2020) 246–256, https://doi.org/10.1038/s41556-020-0463-6.
[89] F. Tang, R. Gao, B. Jeevan-Raj, C.B. Wyss, R.K.R. Kalathur, S. Piscuoglio, C.K. Y. Ng, S.K. Hindupur, S. Nuciforo, E. Dazert, T. Bock, S. Song, D. Buechel, M. F. Morini, A. Hergovich, P. Matthias, D.-S. Lim, L.M. Terracciano, M.H. Heim, M. N. Hall, G. Christofori, LATS1 but not LATS2 represses autophagy by a kinase-independent scaffold function, Nat. Commun. 10 (2019) 5755, https://doi.org/10.1038/s41467-019-13591-7.
[90] F. Tang, G. Christofori, LATS1-Beclin1 mediates a non-canonical connection between the hippo pathway and autophagy, Mol. Cell. Oncol. 7 (2020) 1757378, https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1757378.
[91] C. Joffre, N. Dupont, L. Hoa, V. Gomez, R. Pardo, C. Gonçalves-Pimentel, P. Achard, A. Bettoun, B. Meunier, C. Bauvy, I. Cascone, P. Codogno, M. Fanto, A. Hergovich, J. Camonis, The pro-apoptotic STK38 kinase is a new Beclin1 partner positively regulating autophagy, Curr. Biol. 25 (2015) 2479–2492, https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.031.
[92] C. Joffre, P. Codogno, M. Fanto, A. Hergovich, J. Camonis, STK38 at the crossroad between autophagy and apoptosis, Autophagy 12 (2016) 594–595, https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1135283.
[93] A.P. Martin, M. Jacquemyn, J. Lipecka, C. Chhuon, V.N. Aushev, B. Meunier, M. K. Singh, N. Carpi, M. Piel, P. Codogno, A. Hergovich, M.C. Parrini, G. Zalcman, I. C. Guerrera, D. Daelemans, J.H. Camonis, STK 38 kinase acts as XPO 1 gatekeeper regulating the nuclear export of autophagy proteins and other cargoes, EMBO Rep. 20 (2019) e48150, https://doi.org/10.15252/embr.201948150.
[94] A. Pj, V.N. Martin, G. Aushev, J.H. Camonis Zalcman, The STK38–XPO1 axis, a new actor in physiology and cancer, Cell. Mol. Life Sci. 78 (2021) 1943–1955, https://doi.org/10.1007/s00018-020-03690-w.
[95] Y. Amagai, T. Itoh, M. Fukuda, K. Mizuno, Rabin8 suppresses autophagosome formation independently of its guanine nucleotide-exchange activity towards Rab8, J. Biochem. 158 (2015) 139–153, https://doi.org/10.1093/jb/mvv032.
[96] Z. Wei, X. Hu, Y. Wu, L. Zhou, M. Zhao, Q. Lin, Molecular mechanisms underlying initiation and activation of autophagy, Biomolecules 14 (2024) 1517, https://doi.org/10.3390/biom14121517.
[97] M. Pavel, D.C. Rubinsztein, Mammalian autophagy and the plasma membrane, FEBS J. 284 (2017) 672–679, https://doi.org/10.1111/febs.13931.
[98] E. Zubkova, A. Kalinin, A. Bolotskaya, I. Beloglazova, M. Menshikov, Autophagy-dependent secretion: crosstalk between autophagy and exosome biogenesis, CIMB 46 (2024) 2209–2235, https://doi.org/10.3390/cimb46030142.
[99] L. Li, G. Li, M. Chen, R. Cai, Astragaloside IV enhances the sensibility of lung adenocarcinoma cells to bevacizumab by inhibiting autophagy, Drug Dev. Res. 83 (2022) 461–469, https://doi.org/10.1002/ddr.21878.
[100] S. Chiba, Y. Amagai, Y. Homma, M. Fukuda, K. Mizuno, NDR2-mediated Rabin8 phosphorylation is crucial for ciliogenesis by switching binding specificity from phosphatidylserine to Sec15, EMBO J. 32 (2013) 874–885, https://doi.org/10.1038/emboj.2013.32.
[101] H. Zhao, Z. Khan, C.J. Westlake, Ciliogenesis membrane dynamics and organization, Semin. Cell Dev. Biol. 133 (2023) 20–31, https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.03.021.
[102] C.-H. Sung, M.R. Leroux, The roles of evolutionarily conserved functional modules in cilia-related trafficking, Nat. Cell Biol. 15 (2013) 1387–1397, https://doi.org/10.1038/ncb2888.
[103] H. Hehnly, C.-T. Chen, C.M. Powers, H.-L. Liu, S. Doxsey, The centrosome regulates the Rab11- dependent recycling endosome pathway at appendages of the mother centriole, Curr. Biol. 22 (2012) 1944–1950, https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.022.
[104] M.R. Heider, M. Munson, Exorcising the exocyst complex, Traffic 13 (2012) 898–907, https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01353.x.
[105] S. Abe, T. Nagai, M. Masukawa, K. Okumoto, Y. Homma, Y. Fujiki, K. Mizuno, Localization of protein kinase NDR2 to peroxisomes and its role in Ciliogenesis, J. Biol. Chem. 292 (2017) 4089–4098, https://doi.org/10.1074/jbc.M117.775916.
[106] B.W. Swinkels, S.J. Gould, S. Subramani, Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, FEBS Lett. 305 (1992) 133–136, https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80880-P.
[107] O. Goldstein, A.V. Kukekova, G.D. Aguirre, G.M. Acland, Exonic SINE insertion in STK38L causes canine early retinal degeneration (erd), Genomics 96 (2010) 362–368, https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2010.09.003.
[108] Á.I. Berta, K. Boesze-Battaglia, S. Genini, O. Goldstein, P.J. O'Brien, Á. Szél, G. M. Acland, W.A. Beltran, G.D. Aguirre, Photoreceptor cell death, proliferation and formation of hybrid rod/S-cone photoreceptors in the degenerating STK38L mutant retina, PLoS One 6 (2011) e24074, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024074.
[109] H. Léger, E. Santana, N.A. Leu, E.T. Smith, W.A. Beltran, G.D. Aguirre, F.C. Luca, Ndr kinases regulate retinal interneuron proliferation and homeostasis, Sci. Rep. 8 (2018) 12544, https://doi.org/10.1038/s41598-018-30492-9.
[110] M. Wen, X. Ma, H. Cheng, W. Jiang, X. Xu, Y. Zhang, Y. Zhang, Z. Guo, Y. Yu, H. Xu, C. Qian, X. Cao, H. An, Stk38 protein kinase preferentially inhibits TLR9-activated inflammatory responses by promoting MEKK2 ubiquitination in macrophages, Nat. Commun. 6 (2015) 7167, https://doi.org/10.1038/ncomms8167.
[111] X. Ye, N. Ong, H. An, Y. Zheng, The emerging roles of NDR1/2 in infection and inflammation, Front. Immunol. 11 (2020) 534, https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00534.
[112] D. Tang, H. Xu, X. Du, The role of non-canonical hippo pathway in regulating immune homeostasis, Eur. J. Med. Res. 28 (2023) 498, https://doi.org/10.1186/s40001-023-01484-x.
[113] L. Hong, X. Li, D. Zhou, J. Geng, L. Chen, Role of hippo signaling in regulating immunity, Cell. Mol. Immunol. 15 (2018) 1003–1009, https://doi.org/10.1038/s41423-018-0007-1.
[114] Z. Liu, C. Wu, Y. Pan, H. Liu, X. Wang, Y. Yang, M. Gu, Y. Zhang, X. Wang, NDR2 promotes the antiviral immune response via facilitating TRIM25-mediated RIG-I activation in macrophages, Sci. Adv. 5 (2019) eaav0163, https://doi.org/10.1126/sciadv.aav0163.
[115] W. Liu, J. Li, W. Zheng, Y. Shang, Z. Zhao, S. Wang, Y. Bi, S. Zhang, C. Xu, Z. Duan, L. Zhang, Y.L. Wang, Z. Jiang, W. Liu, L. Sun, Cyclophilin A-regulated ubiquitination is critical for RIG-I-mediated antiviral immune responses, eLife 6 (2017) e24425, https://doi.org/10.7554/eLife.24425.
[116] E. Devroe, P.A. Silver, A. Engelman, HIV-1 incorporates and proteolytically processes human NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases, Virology 331 (2005) 181–189, https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.10.023.
[117] F. Tang, J. Gill, X. Ficht, T. Barthlott, H. Cornils, D. Schmitz-Rohmer, D. Hynx, D. Zhou, L. Zhang, G. Xue, M. Grzmil, Z. Yang, A. Hergovich, G.A. Hollaender, J. V. Stein, B.A. Hemmings, P. Matthias, The kinases NDR1/2 act downstream of the hippo homolog MST1 to mediate both egress of thymocytes from the thymus and lymphocyte motility, Sci. Signal. 8 (2015), https://doi.org/10.1126/scisignal.aab2425.
[118] N. Waldt, A. Seifert, Y.E. Demiray, E. Devroe, B.E. Turk, P. Reichardt, C. Mix, A. Reinhold, C. Freund, A.J. Müller, B. Schraven, O. Stork, S. Kliche, Filamin a phosphorylation at serine 2152 by the serine/threonine kinase Ndr2 controls TCR-induced LFA-1 activation in T cells, Front. Immunol. 9 (2018) 2852, https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02852.
[119] M.J. Bollong, G. Lee, J.S. Coukos, H. Yun, C. Zambaldo, J.W. Chang, E.N. Chin, I. Ahmad, A.K. Chatterjee, L.L. Lairson, P.G. Schultz, R.E. Moellering, A metabolite-derived protein modification integrates glycolysis with KEAP1–NRF2 signalling, Nature 562 (2018) 600–604, https://doi.org/10.1038/s41586-018-0622-0.
[120] Q. Huang, M. Peng, Y. Gu, J. Wu, Y. Zhan, Z. Deng, S. Chen, R. Yang, J. Chen, J. Xie, Metabolism-related gene TXNRD1 regulates inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke through the Nrf2/HO-1 pathway in the small

airway epithelium, Oxidative Med. Cell. Longev. 2022 (2022) 1–16, https://doi.org/10.1155/2022/7067623.
[121] R. Mojzikova, P. Koralkova, D. Holub, Z. Saxova, D. Pospisilova, D. Prochazkova, P. Dzubak, M. Horvathova, V. Divoky, Two novel mutations (p.(Ser160Pro) and p.(Arg472Cys)) causing glucose-6-phosphate isomerase deficiency are associated with erythroid dysplasia and inappropriately suppressed hepcidin, Blood Cell Mol. Dis. 69 (2018) 23–29, https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.04.003.
[122] S.A. Kerk, J. Garcia-Bermudez, K. Birsoy, M.H. Sherman, Y.M. Shah, C.A. Lyssiotis, Spotlight on GOT2 in Cancer metabolism, OTT Volume 16 (2023) 695–702. doi:https://doi.org/10.2147/OTT.S382161.
[123] X. Zhang, H. Zhao, Y. Li, D. Xia, L. Yang, Y. Ma, H. Li, The role of YAP/TAZ activity in cancer metabolic reprogramming, Mol. Cancer 17 (2018) 134, https://doi.org/10.1186/s12943-018-0882-1.
[124] G. Di Benedetto, S. Parisi, T. Russo, F. Passaro, YAP and TAZ mediators at the crossroad between metabolic and cellular reprogramming, Metabolites 11 (2021) 154, https://doi.org/10.3390/metabo11030154.
[125] T. Kashihara, J. Sadoshima, Role of YAP/TAZ in energy metabolism in the heart, J. Cardiovasc. Pharmacol. 74 (2019) 483–490, https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000736.
[126] T. Gao, L. Yang, Y. Zhang, O. Bajinka, X. Yuan, Cancer metabolic reprogramming and precision medicine-current perspective, Front. Pharmacol. 15 (2024) 1450441, https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1450441.
[127] S. Tarabykina, T.L. Griffiths, E. Tulchinsky, J. Mellon, I. Bronstein, M. Kriajevska, Metastasis-associated protein S100A4: spotlight on its role in cell migration, CCDT 7 (2007) 217–228, https://doi.org/10.2174/156800907780618329.
[128] F. Fei, J. Qu, M. Zhang, Y. Li, S. Zhang, S100A4 in cancer progression and metastasis: a systematic review, Oncotarget 8 (2017) 73219–73239, https://doi.org/10.18632/oncotarget.18016.
[129] T. Wang, G. Du, D. Wang, The S100 protein family in lung cancer, Clin. Chim. Acta 520 (2021) 67–70, https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.05.028.
[130] J. Guo, Y. Bian, Y. Wang, L. Chen, A. Yu, X. Sun, *FAM107B* is regulated by *S100A4* and mediates the effect of *S100A4* on the proliferation and migration of MGC803 gastric cancer cells, Cell Biol. Int. 41 (2017) 1103–1109, https://doi.org/10.1002/cbin.10816.
[131] L. Padilla, S. Dakhel, J. Adan, M. Masa, J.M. Martinez, L. Roque, T. Coll, R. Hervas, C. Calvis, L. Llinas, S. Buenestado, J. Castellsague, R. Messeguer, F. Mitjans, J.L. Hernandez, S100A7: from mechanism to cancer therapy, Oncogene 36 (2017) 6749–6761, https://doi.org/10.1038/onc.2017.283.
[132] K. Boye, G.M. Mælandsmo, S100A4 and Metastasis, Am. J. Pathol. 176 (2010) 528–535, https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090526.
[133] Z. Lu, S. Zheng, C. Liu, X. Wang, G. Zhang, F. Wang, S. Wang, J. Huang, S. Mao, Y. Lei, Z. Wang, N. Sun, J. He, S100A7 as a potential diagnostic and prognostic biomarker of esophageal squamous cell carcinoma promotes M2 macrophage infiltration and angiogenesis, Clinical & Translational Med 11 (2021) e459, https://doi.org/10.1002/ctm2.459.
[134] J. Zhang, Y. Gu, X. Liu, X. Rao, G. Huang, Y. Ouyang, Clinicopathological and prognostic value of S100A4 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis, Biosci. Rep. 40 (2020) BSR20201710, https://doi.org/10.1042/BSR20201710.
[135] E.D. Emberley, Y. Niu, L. Curtis, S. Troup, S.K. Mandal, J.N. Myers, S.B. Gibson, L. C. Murphy, P.H. Watson, The S100A7-c-Jun activation domain binding protein 1 pathway enhances Prosurvival pathways in breast Cancer, Cancer Res. 65 (2005) 5696–5702, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3927.
[136] L.O. Xinastle-Castillo, A. Landa, Physiological and modulatory role of thioredoxins in the cellular function, Open Medicine 17 (2022) 2021–2035, https://doi.org/10.1515/med-2022-0596.
[137] R. Seitz, D. Tümen, C. Kunst, P. Heumann, S. Schmid, A. Kandulski, M. Müller, K. Gülow, Exploring the Thioredoxin system as a therapeutic target in Cancer: mechanisms and implications, Antioxidants 13 (2024) 1078, https://doi.org/10.3390/antiox13091078.
[138] R.K. Gandhirajan, M. Jain, B. Walla, M. Johnsen, M.P. Bartram, M. Huynh Anh, M.M. Rinschen, T. Benzing, B. Schermer, Cysteine S-Glutathionylation promotes stability and activation of the hippo downstream effector transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ), J. Biol. Chem. 291 (2016) 11596–11607, https://doi.org/10.1074/jbc.M115.712539.
[139] P. Khanal, Z. Jia, X. Yang, Cysteine residues are essential for dimerization of hippo pathway components YAP2L and TAZ, Sci. Rep. 8 (2018) 3485, https://doi.org/10.1038/s41598-018-21828-6.
[140] T.C. Karlenius, K.F. Tonissen, Thioredoxin and Cancer: a role for Thioredoxin in all states of tumor oxygenation, Cancers 2 (2010) 209–232, https://doi.org/10.3390/cancers2020209.
[141] T. Yuan, S. Rafizadeh, Z. Azizi, B. Lupse, K.D.D. Gorrepati, S. Awal, J. Oberholzer, K. Maedler, A. Ardestani, Proproliferative and antiapoptotic action of exogenously introduced YAP in pancreatic β cells, JCI Insight 1 (2016), https://doi.org/10.1172/jci.insight.86326.
[142] U. Kazimierczak, E. Dondajewska, M. Zajaczkowska, M. Karwacka, T. Kolenda, A. Mackiewicz, LATS1 is a mediator of Melanogenesis in response to oxidative stress and regulator of melanoma growth, IJMS 22 (2021) 3108, https://doi.org/10.3390/ijms22063108.
[143] M. Praskova, F. Xia, J. Avruch, MOBKL1A/MOBKL1B phosphorylation by MST1 and MST2 inhibits cell proliferation, Curr. Biol. 18 (2008) 311–321, https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.02.006.
[144] S. Chanarat, UBL5/Hub1: An atypical ubiquitin-like protein with a typical role as a stress-responsive regulator, IJMS 22 (2021) 9384, https://doi.org/10.3390/ijms22179384.
[145] W. Wang, A.M. Hawkridge, Y. Ma, B. Zhang, J.B. Mangrum, Z.H. Hassan, T. He, S. Blat, C. Guo, H. Zhou, J. Liu, X.-Y. Wang, X. Fang, Ubiquitin-like protein 5 is a novel player in the UPR–PERK arm and ER stress–induced cell death, J. Biol. Chem. 299 (2023) 104915, https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.104915.
[146] K.K. Kolathur, S. Mallya, S. Barve, S.L. Bojja, M.M. Wagle, Moonlighting functions of the ubiquitin-like protein, Hub1/UBL-5, Int. J. Biochem. Cell Biol. 162 (2023) 106445, https://doi.org/10.1016/j.biocel.2023.106445.
[147] P. Hotulainen, E. Paunola, M.K. Vartiainen, P. Lappalainen, Actin-depolymerizing factor and Cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin Depolymerization in mammalian nonmuscle cells, MBoC 16 (2005) 649–664, https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0555.
[148] A. Saito, K. Miyajima, J. Akatsuka, H. Kondo, T. Mashiko, T. Kiuchi, K. Ohashi, K. Mizuno, Ca MKII β-mediated LIM -kinase activation plays a crucial role in BDNF -induced neuritogenesis, Genes Cells 18 (2013) 533–543, https://doi.org/10.1111/gtc.12054.
[149] C. Prunier, R. Prudent, R. Kapur, K. Sadoul, L. Lafanechère, LIM kinases: cofilin and beyond, Oncotarget 8 (2017) 41749–41763, https://doi.org/10.18632/oncotarget.16978.
[150] M. Sakuma, Y. Shirai, K. Yoshino, M. Kuramasu, T. Nakamura, T. Yanagita, K. Mizuno, I. Hide, Y. Nakata, N. Saito, Novel PKCα-mediated phosphorylation site(s) on cofilin and their potential role in terminating histamine release, MBoC 23 (2012) 3707–3721, https://doi.org/10.1091/mbc.e12-01-0053.
[151] C. Shi, Y. Cai, Y. Li, Y. Li, N. Hu, S. Ma, S. Hu, P. Zhu, W. Wang, H. Zhou, Yap promotes hepatocellular carcinoma metastasis and mobilization via governing cofilin/F-actin/lamellipodium axis by regulation of JNK/Bnip3/SERCA/CaMKII pathways, Redox Biol. 14 (2018) 59–71, https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.013.
[152] X. Yang, K. Yu, Y. Hao, D. Li, R. Stewart, K.L. Insogna, T. Xu, LATS1 tumour suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1, Nat. Cell Biol. 6 (2004) 609–617, https://doi.org/10.1038/ncb1140.
[153] R.M. Densham, E. O'Neill, J. Munro, I. König, K. Anderson, W. Kolch, M.F. Olson, MST kinases monitor actin cytoskeletal integrity and signal via c-Jun N-terminal kinase stress-activated kinase to regulate $p21^{Waf1/Cip1}$ stability, Mol. Cell. Biol. 29 (2009) 6380–6390, https://doi.org/10.1128/MCB.00116-09.
[154] J. Xu, Y. Huang, J. Zhao, L. Wu, Q. Qi, Y. Liu, G. Li, J. Li, H. Liu, H. Wu, Cofilin: a promising protein implicated in Cancer metastasis and apoptosis, Front. Cell Dev. Biol. 9 (2021) 599065, https://doi.org/10.3389/fcell.2021.599065.
[155] R. Wei, Y. Zhang, L. Shen, W. Jiang, C. Li, M. Zhong, Y. Xie, D. Yang, L. He, Q. Zhou, Comparative proteomic and radiobiological analyses in human lung adenocarcinoma cells, Mol. Cell. Biochem. 359 (2012) 151–159, https://doi.org/10.1007/s11010-011-1008-x.
[156] A. Kotb, M.E. Hyndman, T.R. Patel, The role of zyxin in regulation of malignancies, Heliyon 4 (2018) e00695, https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00695.
[157] J. Zhou, Y. Zeng, L. Cui, X. Chen, S. Stauffer, Z. Wang, F. Yu, S.M. Lele, G. A. Talmon, A.R. Black, Y. Chen, J. Dong, Zyxin promotes colon cancer tumorigenesis in a mitotic phosphorylation-dependent manner and through CDK8-mediated YAP activation, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 115 (2018), https://doi.org/10.1073/pnas.1800621115.
[158] B. Ma, H. Cheng, R. Gao, C. Mu, L. Chen, S. Wu, Q. Chen, Y. Zhu, Zyxin-Siah2–Lats2 axis mediates cooperation between hippo and TGF-β signalling pathways, Nat. Commun. 7 (2016) 11123, https://doi.org/10.1038/ncomms11123.
[159] A. Partynska, A. Gomulkiewicz, A. Piotrowska, J. Grzegrzolka, A. Rzechonek, K. Ratajczak-Wielgomas, M. Podhorska-Okolow, P. Dziegiel, Expression of Zyxin in non-small cell lung Cancer—a preliminary study, Biomolecules 12 (2022) 827, https://doi.org/10.3390/biom12060827.
[160] X. Song, Q. Li, J. Zhang, A double-edged sword: DLG5 in diseases, Biomed. Pharmacother. 162 (2023) 114611, https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114611.
[161] C. Andolfi, C. Tiribelli, D. Pascut, Recent hints on the dual role of discs large MAGUK scaffold protein 5 in cancers and in hepatocellular carcinoma, Front. Biosci. (Landmark Ed) 27 (2022) 164, https://doi.org/10.31083/j.fbl2705164.
[162] J. Kwan, A. Sczaniecka, E. Heidary Arash, L. Nguyen, C.-C. Chen, S. Ratkovic, O. Klezovitch, L. Attisano, H. McNeill, A. Emili, V. Vasioukhin, DLG5 connects cell polarity and hippo signaling protein networks by linking PAR-1 with MST1/2, Genes Dev. 30 (2016) 2696–2709, https://doi.org/10.1101/gad.284539.116.
[163] J. Liu, J. Li, P. Li, Y. Wang, Z. Liang, Y. Jiang, J. Li, C. Feng, R. Wang, H. Chen, C. Zhou, J. Zhang, J. Yang, P. Liu, Loss of DLG5 promotes breast cancer malignancy by inhibiting the hippo signaling pathway, Sci. Rep. 7 (2017) 42125, https://doi.org/10.1038/srep42125.
[164] D. Paul, V. Chanukuppa, P.J. Reddy, K. Taunk, R. Adhav, S. Srivastava, M. K. Santra, S. Rapole, Global proteomic profiling identifies etoposide chemoresistance markers in non-small cell lung carcinoma, J. Proteome 138 (2016) 95–105, https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.02.008.
[165] J. Che, J. Wang, H. Li, H. Zhen, K. Shang, Y. Yang, B. Cao, Decreased expression of Dlg5 is associated with a poor prognosis and epithelial–mesenchymal transition in squamous cell lung cancer, J. Thorac. Dis. 13 (2021) 3115–3125, https://doi.org/10.21037/jtd-21-752.
[166] P. Venugopal, H. Veyssière, J.-L. Couderc, G. Richard, C. Vachias, V. Mirouse, Multiple functions of the scaffold protein discs large 5 in the control of growth, cell polarity and cell adhesion in Drosophila melanogaster, BMC Dev. Biol. 20 (2020) 10, https://doi.org/10.1186/s12861-020-00218-0.
[167] Z. Zhang, C. Chen, F. Yang, Y.-X. Zeng, P. Sun, P. Liu, X. Li, Itaconate is a lysosomal inducer that promotes antibacterial innate immunity, Mol. Cell 82 (2022) 2844–2857.e10, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.009.

[168] H.-Y. Pan, M. Valapala, Role of TFEB in diseases associated with lysosomal dysfunction, in: J.D. Ash, E. Pierce, R.E. Anderson, C. Bowes Rickman, J. G. Hollyfield, C. Grimm (Eds.), Retinal Degenerative Diseases XIX, Springer International Publishing, Cham, 2023, pp. 319–325, https://doi.org/10.1007/978-3-031-27681-1_46.
[169] I. Rabinovich-Nikitin, L.A. Kirshenbaum, YAP/TFEB pathway promotes autophagic cell death and hypertrophic cardiomyopathy in lysosomal storage diseases, J. Clin. Invest. 131 (2021) e146821, https://doi.org/10.1172/JCI146821.
[170] W. Zhang, J. Shen, F. Gu, Y. Zhang, W. Wu, J. Weng, Y. Liao, Z. Deng, Q. Yuan, L. Zheng, Y. Zhang, W. Shen, Monopolar spindle-one-binder protein 2 regulates the activity of large tumor suppressor/yes-associated protein to inhibit the motility of SMMC-7721 hepatocellular carcinoma cells, Oncol. Lett. (2018), https://doi.org/10.3892/ol.2018.7952.
[171] Y. Yang, N. Luo, Z. Gong, W. Zhou, Y. Ku, Y. Chen, Lactate and lysine lactylation of histone regulate transcription in cancer, Heliyon 10 (2024) e38426, https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38426.
[172] Z. Zong, F. Xie, S. Wang, X. Wu, Z. Zhang, B. Yang, F. Zhou, Alanyl-tRNA synthetase, AARS1, is a lactate sensor and lactyltransferase that lactylates p53 and contributes to tumorigenesis, Cell 187 (2024) 2375–2392.e33, https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.04.002.
[173] J. Ju, H. Zhang, M. Lin, Z. Yan, L. An, Z. Cao, D. Geng, J. Yue, Y. Tang, L. Tian, F. Chen, Y. Han, W. Wang, S. Zhao, S. Jiao, Z. Zhou, The alanyl-tRNA synthetase AARS1 moonlights as a lactyltransferase to promote YAP signaling in gastric cancer, J. Clin. Invest. 134 (2024) e174587, https://doi.org/10.1172/JCI174587.
[174] A.S. Besemer, J. Maus, M.D.A. Ax, A. Stein, S. Vo, C. Freese, K. Nalbach, C. Von Hilchen, I.F. Pfalzgraf, I. Koziollek-Drechsler, B. Silva, H. Huesmann, F. Boukhallouk, L. Florin, A. Kern, C. Behl, A.M. Clement, Receptor-mediated endocytosis 8 (RME-8)/DNAJC13 is a novel positive modulator of autophagy and stabilizes cellular protein homeostasis, Cell. Mol. Life Sci. 78 (2021) 645–660, https://doi.org/10.1007/s00018-020-03521-y.
[175] A. Fujibayashi, T. Taguchi, R. Misaki, M. Ohtani, N. Dohmae, K. Takio, M. Yamada, J. Gu, M. Yamakami, M. Fukuda, S. Waguri, Y. Uchiyama, T. Yoshimori, K. Sekiguchi, Human RME-8 is involved in membrane trafficking through early endosomes, Cell Struct. Funct. 33 (2008) 35–50, https://doi.org/10.1247/csf.07045.
[176] M. Girard, P.S. McPherson, RME-8 regulates trafficking of the epidermal growth factor receptor, FEBS Lett. 582 (2008) 961–966, https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.042.
[177] M. Krupp, A. Weinmann, P. Galle, A. Teufel, Actin binding LIM protein 3 (abLIM3), Int. J. Mol. Med. (2006), https://doi.org/10.3892/ijmm.17.1.129.
[178] B. Gong, T. Qu, J. Zhang, Y. Jia, Z. Song, C. Chen, J. Yang, C. Wang, Y. Liu, Y. Jin, W. Cao, Q. Zhao, Downregulation of ABLIM3 confers to the metastasis of neuroblastoma via regulating the cell adhesion molecules pathway, computational and structural, Biotechnol. J. 23 (2024) 1547–1561, https://doi.org/10.1016/j.csbj.2024.04.024.
[179] C. Garrido, L. Galluzzi, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot, G. Kroemer, Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria, Cell Death Differ. 13 (2006) 1423–1433, https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950.
[180] S.W. Chan, C. Ong, W. Hong, The recent advances and implications in cancer therapy for the hippo pathway, Curr. Opin. Cell Biol. 93 (2025) 102476, https://doi.org/10.1016/j.ceb.2025.102476.
[181] N. Furth, Y. Aylon, M. Oren, p53 shades of hippo, Cell Death Differ. 25 (2018) 81–92, https://doi.org/10.1038/cdd.2017.163.
[182] L.S. Gutierrez, J. Gutierrez, Thrombospondin 1 in metabolic diseases, Front. Endocrinol. 12 (2021) 638536, https://doi.org/10.3389/fendo.2021.638536.
[183] K.P.C. Catral, C.-Y. Tse, W.-Y. Yang, C.-Y. Ling, O.-L. Kwok, K.-Y. Choy, D.-Q. Lu, J.-F. Bian, T.C. Lam, D.Y.-Y. Tse, S.S.-W. Shan, Thrombospondin 1 mediates autophagy upon inhibition of the rho-associated protein kinase inhibitor, Cells 13 (2024) 1907, https://doi.org/10.3390/cells13221907.
[184] A. Arun, K.J. Rayford, A. Cooley, T. Rana, G. Rachakonda, F. Villalta, S. Pratap, M.F. Lima, N. Sheibani, P.N. Nde, Thrombospondin-1 expression and modulation of Wnt and hippo signaling pathways during the early phase of Trypanosoma cruzi infection of heart endothelial cells, PLoS Negl. Trop. Dis. 16 (2022) e0010074, https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010074.
[185] J. Shen, B. Cao, Y. Wang, C. Ma, Z. Zeng, L. Liu, X. Li, D. Tao, J. Gong, D. Xie, Hippo component YAP promotes focal adhesion and tumour aggressiveness via transcriptionally activating THBS1/FAK signalling in breast cancer, J. Exp. Clin. Cancer Res. 37 (2018) 175, https://doi.org/10.1186/s13046-018-0850-z.
[186] S. Maghool, N.D.G. Cooray, D.A. Stroud, D. Aragão, M.T. Ryan, M.J. Maher, Structural and functional characterization of the mitochondrial complex IV assembly factor Coa6, Life Sci. Alliance 2 (2019) e201900458, https://doi.org/10.26508/lsa.201900458.
[187] X. Jin, X. Chen, H. Yu, Y. Liu, X. Lu, H. Yin, W. Dai, COA6 promotes the oncogenesis and progression of breast cancer by oxidative phosphorylation pathway, J. Cancer 15 (2024) 5072–5084, https://doi.org/10.7150/jca.98570.
[188] M. Zhang, X. Liao, G. Ji, X. Fan, Q. Wu, High expression of COA6 is related to unfavorable prognosis and enhanced oxidative phosphorylation in lung adenocarcinoma, IJMS 24 (2023) 5705, https://doi.org/10.3390/ijms24065705.
[189] W. Liu, Y. Jiang, G. Li, D. Huang, T. Qin, Oxidative phosphorylation related gene COA6 is a novel indicator for the prognosis and immune response in lung adenocarcinoma, Sci. Rep. 14 (2024) 25970, https://doi.org/10.1038/s41598-024-77775-y.
[190] J.G. Routsias, D. Marinou, M. Mavrouli, A. Tsakris, V.C. Pitiriga, Major vault protein/lung resistance-related protein: a novel biomarker for inflammation and acute infections, Microorganisms 12 (2024) 1762, https://doi.org/10.3390/microorganisms12091762.
[191] E. Steiner, K. Holzmann, L. Elbling, M. Micksche, W. Berger, Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance, CDT 7 (2006) 923–934, https://doi.org/10.2174/138945006778019345.
[192] P.C. Lara, M. Pruschy, M. Zimmermann, L.A. Henríquez-Hernández, MVP and vaults: a role in the radiation response, Radiat. Oncol. 6 (2011) 148, https://doi.org/10.1186/1748-717X-6-148.
[193] D. Lötsch, E. Steiner, K. Holzmann, S. Spiegl-Kreinecker, C. Pirker, J. Hlavaty, H. Petznek, B. Hegedus, T. Garay, T. Mohr, W. Sommergruber, M. Grusch, W. Berger, Major vault protein supports glioblastoma survival and migration by upregulating the EGFR/PI3K signalling axis, Oncotarget 4 (2013) 1904–1918, https://doi.org/10.18632/oncotarget.1264.
[194] K. Iwashita, R. Ikeda, Y. Takeda, T. Sumizawa, T. Furukawa, T. Yamaguchi, S. Akiyama, K. Yamada, Major vault protein forms complexes with hypoxia-inducible factor (HIF)-1α and reduces HIF-1α level in ACHN human renal adenocarcinoma cells, Cancer Sci. 101 (2010) 920–926, https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01481.x.
[195] H. Bai, C. Wang, Y. Qi, J. Xu, N. Li, L. Chen, B. Jiang, X. Zhu, H. Zhang, X. Li, Q. Yang, J. Ma, Y. Xu, J. Ben, Q. Chen, Major vault protein suppresses lung cancer cell proliferation by inhibiting STAT3 signaling pathway, BMC Cancer 19 (2019) 454, https://doi.org/10.1186/s12885-019-5665-6.
[196] G. Frascotti, E. Galbiati, M. Mazzucchelli, M. Pozzi, L. Salvioni, J. Vertemara, P. Tortora, The vault nanoparticle: a gigantic ribonucleoprotein assembly involved in diverse physiological and pathological phenomena and an ideal Nanovector for drug delivery and therapy, Cancers 13 (2021) 707, https://doi.org/10.3390/cancers13040707.
[197] S. Kolli, C.I. Zito, M.H. Mossink, E.A.C. Wiemer, A.M. Bennett, The major vault protein is a novel substrate for the tyrosine phosphatase SHP-2 and scaffold protein in epidermal growth factor signaling, J. Biol. Chem. 279 (2004) 29374–29385, https://doi.org/10.1074/jbc.M313955200.
[198] L. Gong, M. Zhong, K. Gong, Z. Wang, Y. Zhong, Y. Jin, H. Chen, P. Tai, X. Chen, A. Chen, K. Cao, Multi-omics analysis and verification of the oncogenic value of CCT8 in Pan-cancers, JIR Volume 16 (2023) 2297–2315. doi:https://doi.org/10.2147/JIR.S403499.
[199] R. Du, Z. Zhou, Y. Huang, K. Li, K. Guo, L. Han, H. Bian, Chaperonin-containing TCP-1 subunit genes are potential prognostic biomarkers and are correlated with Th2 cell infiltration in lung adenocarcinoma: An observational study, Medicine 103 (2024) e38387, https://doi.org/10.1097/MD.0000000000038387.
[200] K.R. Willison, The structure and evolution of eukaryotic chaperonin-containing TCP-1 and its mechanism that folds actin into a protein spring, Biochem. J. 475 (2018) 3009–3034, https://doi.org/10.1042/BCJ20170378.
[201] X. Yang, H. Ren, Y. Shao, Y. Sun, L. Zhang, H. Li, X. Zhang, X. Yang, W. Yu, J. Fu, Chaperonin-containing T-complex protein 1 subunit 8 promotes cell migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by regulating α-actin and β-tubulin expression, Int. J. Oncol. (2018), https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4335.
[202] S. Grant, FAM83A and FAM83B: candidate oncogenes and TKI resistance mediators, J. Clin. Invest. 122 (2012) 3048–3051, https://doi.org/10.1172/JCI64412.
[203] R. Cipriano, B.L. Bryson, K.L.S. Miskimen, C.A. Bartel, W. Hernandez-Sanchez, R. C. Bruntz, S.A. Scott, C.W. Lindsley, H.A. Brown, M.W. Jackson, Hyperactivation of EGFR and downstream effector phospholipase D1 by oncogenic FAM83B, Oncogene 33 (2014) 3298–3306, https://doi.org/10.1038/onc.2013.293.
[204] R. Cipriano, J. Graham, K.L.S. Miskimen, B.L. Bryson, R.C. Bruntz, S.A. Scott, H. A. Brown, G.R. Stark, M.W. Jackson, FAM83B mediates EGFR- and RAS-driven oncogenic transformation, J. Clin. Invest. 122 (2012) 3197–3210, https://doi.org/10.1172/JCI60517.
[205] R. Cipriano, K.L.S. Miskimen, B.L. Bryson, C.R. Foy, C.A. Bartel, M.W. Jackson, FAM83B-mediated activation of PI3K/AKT and MAPK signaling cooperates to promote epithelial cell transformation and resistance to targeted therapies, Oncotarget 4 (2013) 729–738, https://doi.org/10.18632/oncotarget.1027.
[206] J. Ji, X. Cheng, R. Du, Y. Xie, Y. Zhang, Advances in research on autophagy mechanisms in resistance to endometrial cancer treatment, Front. Oncol. 14 (2024) 1364070, https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1364070.
[207] J. Wang, P. Li, L. Sun, J. Zhang, K. Yue, Y. Wang, X. Wu, FAM83B regulates mitochondrial metabolism and anti-apoptotic activity in pulmonary adenocarcinoma, Apoptosis 29 (2024) 743–756, https://doi.org/10.1007/s10495-024-01944-7.
[208] L. Manganaro, S. Bianco, P. Bironzo, F. Cipollini, D. Colombi, D. Corà, G. Corti, G. Doronzo, L. Errico, P. Falco, L. Gandolfi, F. Guerrera, V. Monica, S. Novello, M. Papotti, S. Parab, A. Pittaro, L. Primo, L. Righi, G. Sabbatini, A. Sandri, S. Vattakunnel, F. Bussolino, G.V. Scagliotti, Consensus clustering methodology to improve molecular stratification of non-small cell lung cancer, Sci. Rep. 13 (2023) 7759, https://doi.org/10.1038/s41598-023-33954-x.
[209] Y.-W. Zheng, Z.-H. Li, L. Lei, C.-C. Liu, Z. Wang, L.-R. Fei, M.-Q. Yang, W.-J. Huang, H.-T. Xu, FAM83A promotes lung Cancer progression by regulating the Wnt and hippo signaling pathways and indicates Poor prognosis, Front. Oncol. 10 (2020) 180, https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00180.
[210] S. Richtmann, D. Wilkens, A. Warth, F. Lasitschka, H. Winter, P. Christopoulos, F. J.F. Herth, T. Muley, M. Meister, M.A. Schneider, FAM83A and FAM83B as prognostic biomarkers and potential new therapeutic targets in NSCLC, Cancers 11 (2019) 652, https://doi.org/10.3390/cancers11050652.
[211] L. Cai, D. Luo, B. Yao, D.M. Yang, S. Lin, L. Girard, R.J. DeBerardinis, J.D. Minna, Y. Xie, G. Xiao, Systematic analysis of gene expression in lung adenocarcinoma

and squamous cell carcinoma with a case study of FAM83A and FAM83B, Cancers 11 (2019) 886, https://doi.org/10.3390/cancers11060886.
[212] A. Bhattacharya, R. Torggler, W. Reiter, N. Romanov, M. Licheva, A. Ciftci, M. Mari, L. Kolb, D. Kaiser, F. Reggiori, G. Ammerer, D.M. Hollenstein, C. Kraft, Decoding the function of Atg13 phosphorylation reveals a role of Atg11 in bulk autophagy initiation, EMBO Rep. 25 (2024) 813–831, https://doi.org/10.1038/s44319-023-00055-9.
[213] S.Y. Park, X. Guo, Adaptor protein complexes and intracellular transport, Biosci. Rep. 34 (2014) e00123, https://doi.org/10.1042/BSR20140069.
[214] F. Nakatsu, H. Ohno, Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network, Cell Struct. Funct. 28 (2003) 419–429, https://doi.org/10.1247/csf.28.419.
[215] J. Jeong, Y.E. Hwang, M. Lee, S. Keum, S. Song, J. Kim, J. Choi, S. Rhee, Downregulation of AP1S1 causes the lysosomal degradation of EGFR in non-small cell lung cancer, journal cellular, Physiology 238 (2023) 2335–2347, https://doi.org/10.1002/jcp.31112.
[216] X. Chen, J. Zhang, P. Liu, Y. Wei, X. Wang, J. Xiao, C. Wang, L. Wang, Proteolytic processing of secretory pathway kinase Fam20C by site-1 protease promotes biomineralization, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 118 (2021) e2100133118, https://doi.org/10.1073/pnas.2100133118.
[217] Q.-Q. Li, M. Guo, G.-H. He, K.-H. Xi, M.-Y. Zhou, R.-Y. Shi, G.-Q. Chen, VEGF-induced Nrdp1 deficiency in vascular endothelial cells promotes cancer metastasis by degrading vascular basement membrane, Oncogene 43 (2024) 1836–1851, https://doi.org/10.1038/s41388-024-03038-9.
[218] C.R.R. Costa, R. Chalgoumi, A. Baker, C. Guillou, P.M. Yamaguti, V. Simancas Escorcia, L. Abbad, B.R. Amorin, C.L. De Lima, V. Cannaya, M. Benassarou, A. Berdal, C. Chatziantoniou, O. Cases, P. Cosette, R. Kozyraki, A.C. Acevedo, Gingival proteomics reveals the role of TGF beta and YAP/TAZ signaling in Raine syndrome fibrosis, Sci. Rep. 14 (2024) 9497, https://doi.org/10.1038/s41598-024-59713-0.
[219] H. Li, L. Tong, H. Tao, Z. Liu, Genome-wide analysis of the hypoxia-related DNA methylation-driven genes in lung adenocarcinoma progression, Biosci. Rep. 40 (2020) BSR20194200, https://doi.org/10.1042/BSR20194200.
[220] I.V. Demidyuk, A.V. Shubin, E.V. Gasanov, A.M. Kurinov, V.V. Demkin, T. V. Vinogradova, M.V. Zinovyeva, A.V. Sass, I.B. Zborovskaya, S.V. Kostrov, Alterations in gene expression of Proprotein convertases in human lung Cancer have a limited number of scenarios, PLoS One 8 (2013) e55752, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055752.
[221] Y. Shionoya, T. Kanaseki, S. Miyamoto, S. Tokita, A. Hongo, Y. Kikuchi, V. Kochin, K. Watanabe, R. Horibe, H. Saijo, T. Tsukahara, Y. Hirohashi, H. Takahashi, N. Sato, T. Torigoe, Loss of tapasin in human lung and colon cancer cells and escape from tumor-associated antigen-specific CTL recognition, OncoImmunology 6 (2017) e1274476, https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1274476.
[222] B.A. Peters, H.I. Pass, R.D. Burk, X. Xue, C. Goparaju, C.C. Sollecito, E. Grassi, L. N. Segal, J.-C.J. Tsay, R.B. Hayes, J. Ahn, The lung microbiome, peripheral gene expression, and recurrence-free survival after resection of stage II non-small cell lung cancer, Genome Med. 14 (2022) 121, https://doi.org/10.1186/s13073-022-01126-7.
[223] L. Peng, L. Zhou, H. Li, X. Zhang, S. Li, K. Wang, M. Yang, X. Ma, D. Zhang, S. Xiang, Y. Duan, T. Wang, C. Sun, C. Wang, D. Lu, M. Qian, Z. Wang, Hippo-signaling-controlled MHC class I antigen processing and presentation pathway potentiates antitumor immunity, Cell Rep. 43 (2024) 114003, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114003.
[224] N. Carvou, R. Holic, M. Li, C. Futter, A. Skippen, S. Cockcroft, Phosphatidylinositol- and phosphatidylcholine-transfer activity of PITPβ is essential for COPI-mediated retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum, J. Cell Sci. 123 (2010) 1262–1273, https://doi.org/10.1242/jcs.061986.
[225] F.-L. Li, V. Fu, G. Liu, T. Tang, A.W. Konradi, X. Peng, E. Kemper, B.F. Cravatt, J. M. Franklin, Z. Wu, J. Mayfield, J.E. Dixon, W.H. Gerwick, K.-L. Guan, Hippo pathway regulation by phosphatidylinositol transfer protein and phosphoinositides, Nat. Chem. Biol. 18 (2022) 1076–1086, https://doi.org/10.1038/s41589-022-01061-z.
[226] L. Palamiuc, J.L. Johnson, Z. Haratipour, R.M. Loughran, W.J. Choi, G.K. Arora, V. Tieu, K. Ly, A. Llorente, S. Crabtree, J.C.Y. Wong, A. Ravi, T. Wiederhold, R. Murad, R.D. Blind, B.M. Emerling, Hippo and PI5P4K signaling intersect to control the transcriptional activation of YAP, Sci. Signal. 17 (2024) eado6266, https://doi.org/10.1126/scisignal.ado6266.
[227] H. Yang, X. Zhang, C. Wang, H. Zhang, J. Yi, K. Wang, Y. Hou, P. Ji, X. Jin, C. Li, M. Zhang, S. Huang, H. Jia, K. Hu, L. Mou, R. Wang, Microcolin H, a novel autophagy inducer, exerts potent antitumour activity by targeting PITPα/β, Sig Transduct Target Ther 8 (2023) 428, https://doi.org/10.1038/s41392-023-01667-2.
[228] M.S. Khan, B.H. Jaswanth Gowda, W.H. Almalki, T. Singh, A. Sahebkar, P. Kesharwani, Unravelling the potential of mitochondria-targeted liposomes for enhanced cancer treatment, Drug Discov. Today 29 (2024) 103819, https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103819.
[229] N.K. Farsani, S. Afshari, A.S. Poor, A. Toutounchi, Z. Shahbazi, S. Ramezani, M. Tajik, M.M. Chegeni, N.A. Moghaddam, H. Abbasi, pH-responsive mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid and chitosan for targeted epirubicin delivery: in vitro and in vivo efficacy in breast cancer, Int. J. Biol. Macromol. (2025) 142558, https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.142558.
[230] S.H. Hassanpour, M. Dehghani, Review of cancer from perspective of molecular, Journal of Cancer Research and Practice 4 (2017) 127–129, https://doi.org/10.1016/j.jcrpr.2017.07.001.
[231] A.M. Grimaldi, M. Salvatore, M. Incoronato, miRNA-based therapeutics in breast Cancer: a systematic review, Front. Oncol. 11 (2021) 668464, https://doi.org/10.3389/fonc.2021.668464.
[232] Z. Liu, Y. Ren, S. Weng, H. Xu, L. Li, X. Han, A new trend in Cancer treatment: the combination of epigenetics and immunotherapy, Front. Immunol. 13 (2022) 809761, https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.809761.
[233] W. Wei, Z.-N. Chen, K. Wang, CRISPR/Cas9: a powerful strategy to improve CAR-T cell persistence, IJMS 24 (2023) 12317, https://doi.org/10.3390/ijms241512317.
[234] X. Cai, X. Bao, Y. Wu, Metal–Organic Frameworks as Intelligent Drug Nanocarriers for Cancer Therapy, Pharmaceutics 14 (2022) 2641, https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122641.
[235] E. Keles, Y. Song, D. Du, W.-J. Dong, Y. Lin, Recent progress in nanomaterials for gene delivery applications, Biomater. Sci. 4 (2016) 1291–1309, https://doi.org/10.1039/C6BM00441E.
[236] M.S. Khan, M. Fatima, S. Wahab, M. Khalid, P. Kesharwani, Gallic acid loaded self-nano emulsifying hydrogel-based drug delivery system against onychomycosis, Nanomedicine 19 (2024) 2065–2083, https://doi.org/10.1080/17435889.2024.2386923.
[237] M. Sameer Khan, B.H. Jaswanth Gowda, N. Hasan, G. Gupta, T. Singh, S. Md, P. Kesharwani, Carbon nanotube-mediated platinum-based drug delivery for the treatment of cancer: advancements and future perspectives, Eur. Polym. J. 206 (2024) 112800, https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.112800.
[238] M. Fu, Y. Hu, T. Lan, K.-L. Guan, T. Luo, M. Luo, The hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases, Sig Transduct Target Ther 7 (2022) 376, https://doi.org/10.1038/s41392-022-01191-9.
[239] E.R. Barry, V. Simov, I. Valtingojer, O. Venier, Recent therapeutic approaches to modulate the hippo pathway in oncology and regenerative medicine, Cells 10 (2021) 2715, https://doi.org/10.3390/cells10102715.
[240] S. Li, L. Hao, N. Li, X. Hu, H. Yan, E. Dai, X. Shi, Targeting the hippo/YAP1 signaling pathway in hepatocellular carcinoma: from mechanisms to therapeutic drugs (review), Int. J. Oncol. 65 (2024) 88, https://doi.org/10.3892/ijo.2024.5676.
[241] F. Fan, Z. He, L.-L. Kong, Q. Chen, Q. Yuan, S. Zhang, J. Ye, H. Liu, X. Sun, J. Geng, L. Yuan, L. Hong, C. Xiao, W. Zhang, X. Sun, Y. Li, P. Wang, L. Huang, X. Wu, Z. Ji, Q. Wu, N.-S. Xia, N.S. Gray, L. Chen, C.-H. Yun, X. Deng, D. Zhou, Pharmacological targeting of kinases MST1 and MST2 augments tissue repair and regeneration, Sci. Transl. Med. 8 (2016), https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf2304.
[242] S. Qi, Y. Zhu, X. Liu, P. Li, Y. Wang, Y. Zeng, A. Yu, Y. Wang, Z. Sha, Z. Zhong, R. Zhu, H. Yuan, D. Ye, S. Huang, C. Ling, Y. Xu, D. Zhou, L. Zhang, F.-X. Yu, WWC proteins mediate LATS1/2 activation by hippo kinases and imply a tumor suppression strategy, Mol. Cell 82 (2022) 1850–1864.e7, https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.027.
[243] R. Watkins, A. Gamo, S.H. Choi, M. Kumar, E. Buckarma, C. McCabe, J. Tomlinson, D. Pereya, B. Lupse, S. Geravandi, N.W. Werneburg, C. Wang, P. Starlinger, S. Zhu, S. Li, S. Yu, M. Surakattula, T. Baguley, A. Ardestani, K. Maedler, J. Roland, V. Nguyen-Tran, S. Joseph, M. Petrassi, N. Rogers, G. Gores, A. Chatterjee, M. Tremblay, W. Shen, R. Smoot, A small molecule MST1/2 inhibitor accelerates murine liver regeneration with improved survival in models of steatohepatitis, PNAS Nexus 3 (2024) pgae096, https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgae096.
[244] G. Loforese, T. Malinka, A. Keogh, F. Baier, C. Simillion, M. Montani, T. D. Halazonetis, D. Candinas, D. Stroka, Impaired liver regeneration in aged mice can be rescued by silencing hippo core kinases MST1 and MST2, EMBO Mol. Med. 9 (2017) 46–60, https://doi.org/10.15252/emmm.201506089.
[245] W.-W. Pan, T. Moroishi, J.H. Koo, K.-L. Guan, Cell type-dependent function of LATS1/2 in cancer cell growth, Oncogene 38 (2019) 2595–2610, https://doi.org/10.1038/s41388-018-0610-8.
[246] J. Brennecke, A. Stark, R.B. Russell, S.M. Cohen, Principles of MicroRNA–target recognition, PLoS Biol. 3 (2005) e85, https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085.
[247] M. Friedrich, A. Aigner, Therapeutic siRNA: state-of-the-art and future perspectives, BioDrugs 36 (2022) 549–571, https://doi.org/10.1007/s40259-022-00549-3.
[248] C. Selvam, D. Mutisya, S. Prakash, K. Ranganna, R. Thilagavathi, Therapeutic potential of chemically modified si RNA : recent trends, Chem. Biol. Drug Des. 90 (2017) 665–678, https://doi.org/10.1111/cbdd.12993.
[249] Z. Liu, N. Parveen, U. Rehman, A. Aziz, A. Sheikh, M.A.S. Abourehab, W. Guo, J. Huang, Z. Wang, P. Kesharwani, Unravelling the enigma of siRNA and aptamer mediated therapies against pancreatic cancer, Mol. Cancer 22 (2023) 8, https://doi.org/10.1186/s12943-022-01696-5.
[250] A. Wittrup, J. Lieberman, Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics, Nat. Rev. Genet. 16 (2015) 543–552, https://doi.org/10.1038/nrg3978.
[251] K. Wang, H. Chen, S. Qin, S. Chen, Q. Zhang, J. Chen, D. Di, G. Su, Y. Yuan, Co-delivery of pirfenidone and siRNA in ZIF-based nanoparticles for dual inhibition of hepatic stellate cell activation in liver fibrotic therapy, Colloids Surf. B: Biointerfaces 231 (2023) 113567, https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113567.
[252] Y. Li, K. Zhang, P. Liu, M. Chen, Y. Zhong, Q. Ye, M.Q. Wei, H. Zhao, Z. Tang, Encapsulation of Plasmid DNA by Nanoscale Metal–Organic Frameworks for Efficient Gene Transportation and Expression, Adv. Mater. 31 (2019) 1901570, https://doi.org/10.1002/adma.201901570.
[253] P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J.F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, J.-S. Chang, Y.K. Hwang, V. Marsaud, P.-

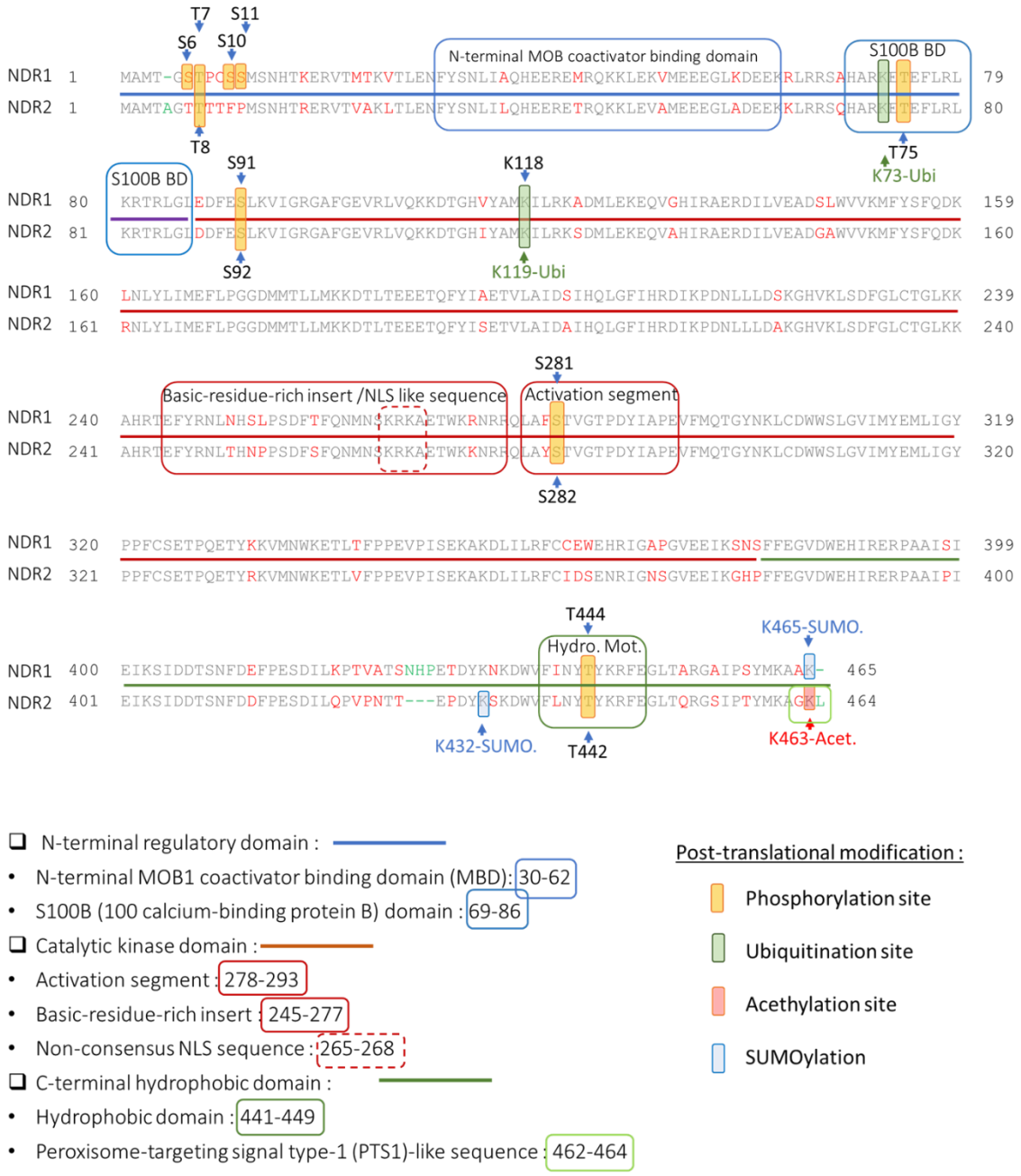
N. Bories, L. Cynober, S. Gil, G. Férey, P. Couvreur, R. Gref, Porous metal–organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging, Nat. Mater. 9 (2010) 172–178, https://doi.org/10.1038/nmat2608.

[254] Y. Yan, X.-Y. Liu, A. Lu, X.-Y. Wang, L.-X. Jiang, J.-C. Wang, Non-viral vectors for RNA delivery, J. Control. Release 342 (2022) 241–279, https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.008.

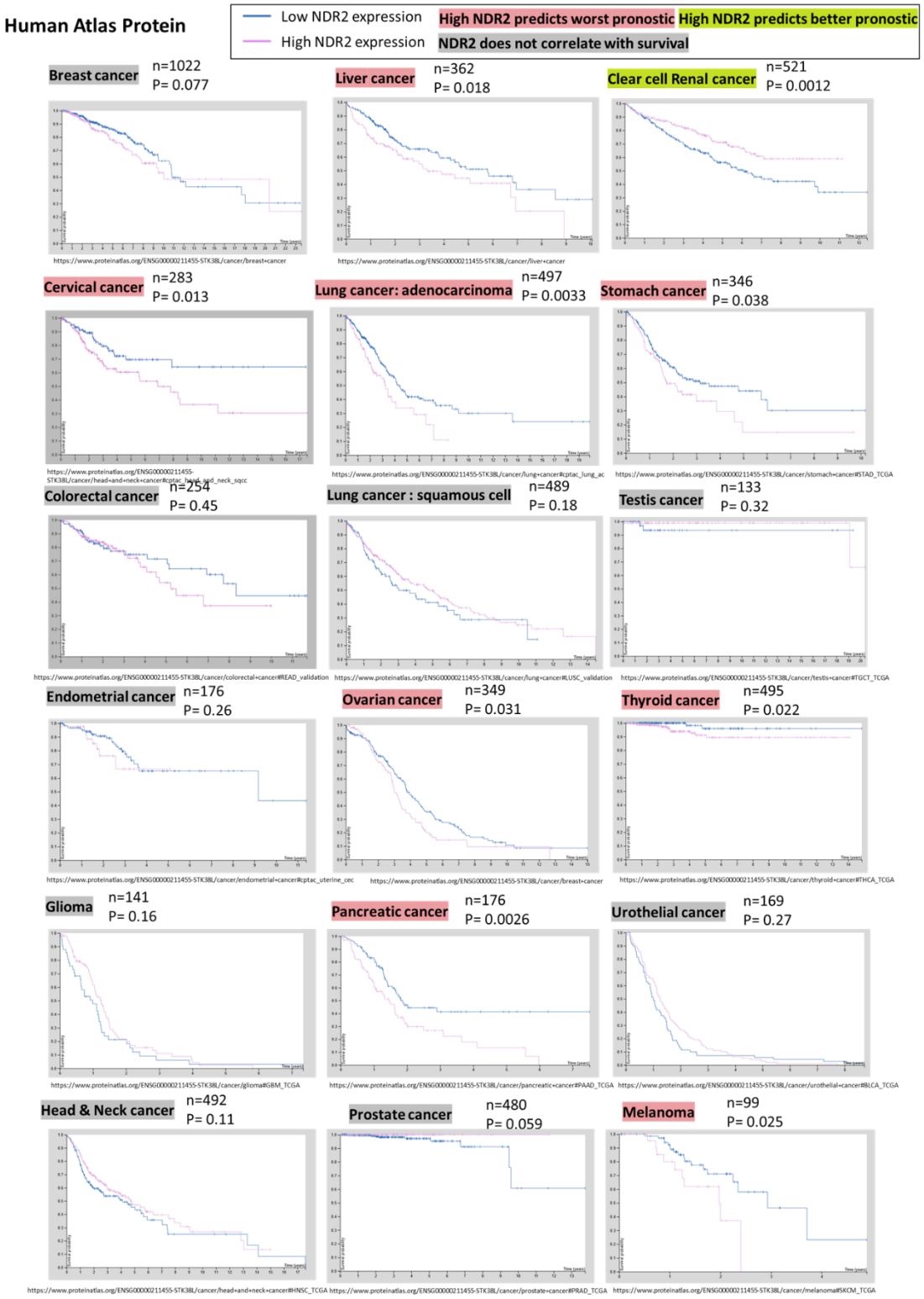
[255] S. Ghojavand, E. Dib, S. Mintova, Flexibility in zeolites: origin, limits, and evaluation, Chem. Sci. 14 (2023) 12430–12446, https://doi.org/10.1039/D3SC03934J.

[256] S. Mintova, Maximizing catalytic efficiency with bio-inspired hierarchical porous zeolites, Natl. Sci. Rev. 10 (2023) nwad155, https://doi.org/10.1093/nsr/nwad155.

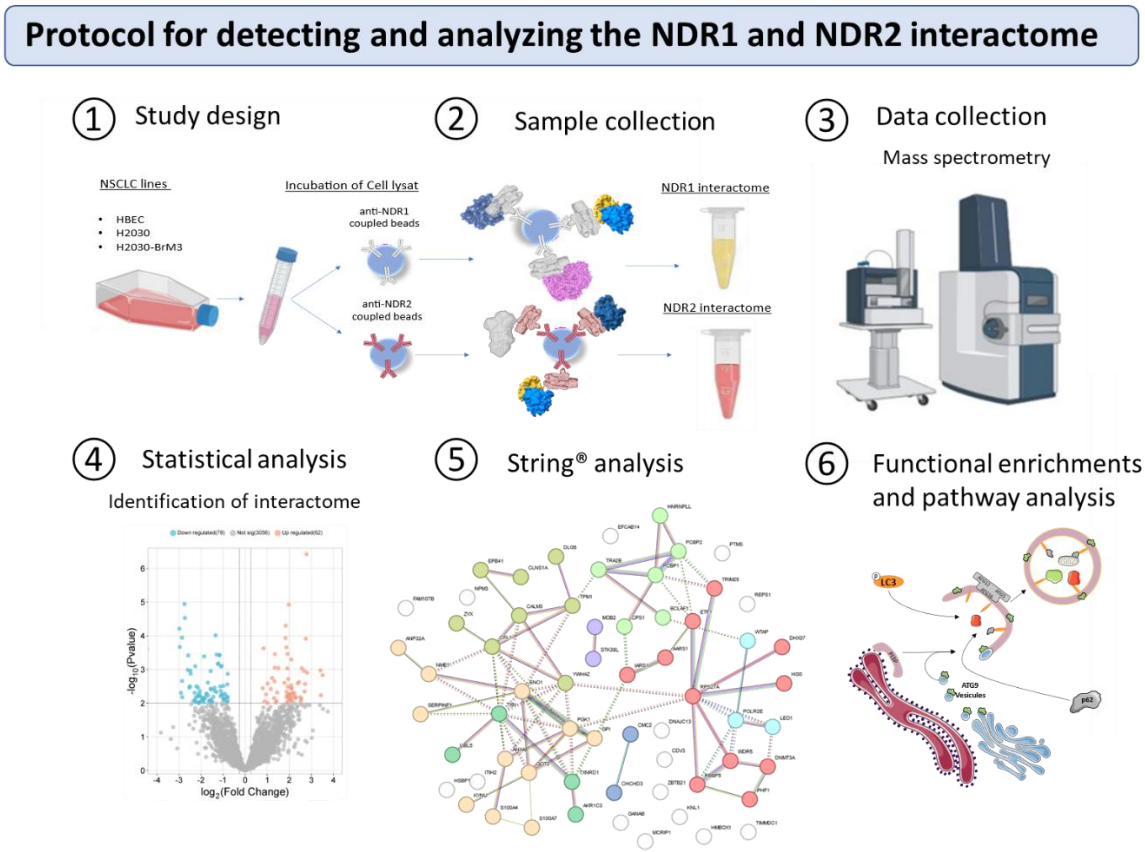
[257] C. Anfray, B. Dong, S. Komaty, S. Mintova, S. Valable, Acute toxicity of Silver free and encapsulated in Nanosized zeolite for eukaryotic cells, ACS Appl. Mater. Interfaces 9 (2017) 13849–13854, https://doi.org/10.1021/acsami.7b00265.




**Supplemental Figure 1. Sequence alignment and comparison between NDR1 and NDR2.** The specific functional domains: N-terminal MOB coactivator binding domain (BD), S100B binding domain (BD), Basic-residue-rich insert, Activation segment, Hydrophobic domain and PTS1-like sequence were boxed. Phosphorylation, SUMOylation (SUMO.), Acetylation (Acet.) and Ubiquitination (Ubi) sites are numbered and located by arrowhead.




**Supplemental Figure 2. Correlation between NDR2 expression and survival prognostic of patients for different type of cancer.** This analysis was conducted using the Human Protein Atlas database (Human Atlas Protein, v24.0.proteinatlas.org).




**Supplemental Figure 3. Overview of the Protocol for detecting and analyzing the NDR1 and NDR2 interactome.**

The interactomes of NDR1 and NDR2 were constructed through co-immunoprecipitation using NDR1-coupled IgG or NDR2-coupled IgG on non-tumoral human lung epithelial cells (HBEC) and lung adenocarcinoma cells (H2030), including both primitive (H2030) and brain metastatic (H2030-BrM3) variants. LC-MS quantitative DIA label-free analysis was conducted using biological triplicates for each condition. Differential proteins were identified through enrichment analysis based on linear models and empirical Bayes statistics, applying a 1.2-fold increase threshold and a p-value of 0.05. The STRING database (https://string-db.org/) was utilized to cluster the NDR2 interactome and analyze functional protein association networks

**Supplemental Table 1**: Proteins co-immunoprecipitated by the anti-NDR1 antibody and anti-NDR2 antibody from HBEC, H2030 and H2030-BrM3 cell extracts.

| Cell line | NDR1 Log2FC | NDR2 Log2FC | Protein.Ids | Protein Names | Genes | Protein names | Biological Process (GO annotation) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HBEC | 5.68 | 5.62 | B9EJG8 | T150C_HUMAN | TMEM150C | Transmembrane protein 150C | Cellular response to mechanical stimulus |
| HBEC | 1.9 | 1.62 | P05198 | IF2A_HUMAN | EIF2S1 | Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 | Response to endoplasmic reticulum stress |
| HBEC | 2.23 | 3.07 | P40925 | MDHC_HUMAN | MDH1 | Malate dehydrogenase, cytoplasmic | Malate metabolic process |
| HBEC | 1.98 | 2.15 | P61218 | RPAB2_HUMAN | POLR2F | DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC2 | Transcription by RNA polymerase |
| HBEC | 1.88 | 2.31 | P83916 | CBX1_HUMAN | CBX1 | Chromobox protein homolog 1 | DNA damage response |
| HBEC | 1.63 | 1.83 | Q14257 | RCN2_HUMAN | RCN2 | Reticulocalbin-2 | Calcium ion binding |
| HBEC | 3.24 | 2.89 | Q15208 | STK38_HUMAN | STK38 | Serine/threonine-protein kinase 38 (NDR1) | Intracellular signal transduction |
| HBEC | 1.42 | 1.62 | Q32MZ4 | LRRF1_HUMAN | LRRFIP1 | Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1 | Negative regulation of transcription by RNA polymerase II |
| HBEC | 2.09 | 2.00 | Q9BSJ5 | CQ080_HUMAN | MTNAP1 | Mitochondrial nucleoid-associated protein 1 | Regulator of mitochondrial DNA (mtDNA) abundance |
| HBEC | 1.39 | 1.41 | Q9BTT4 | MED10_HUMAN | MED10 | Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10 | Positive regulation of transcription by RNA polymerase II |
| HBEC | 1.32 | 1.99 | Q9NVX2 | NLE1_HUMAN | NLE1 | Notchless protein homolog 1 | Notch signaling pathway |
| | | | | | | | |
| **Cell line** | **NDR1 Log2FC** | **NDR2 Log2FC** | **Protein.Ids** | **Protein Names** | **Genes** | **Protein names** | **Biological Process (GO annotation)** |
| H2030 | 2.17 | 1.92 | O14744 | ANM5_HUMAN | PRMT5 | Protein arginine N-methyltransferase 5 | Chromatin remodeling |
| H2030 | 1.42 | 1.44 | O60716 | CTND1_HUMAN | CTNND1 | Catenin delta-1 | Cell-cell adhesion |
| H2030 | 1.36 | 1.89 | O94929 | ABLM3_HUMAN | ABLIM3 | Actin-binding LIM protein 3 | Cytoskeleton organization |
| H2030 | 2.13 | 1.84 | P17655 | CAN2_HUMAN | CAPN2 | Calpain-2 catalytic subunit | Focal adhesion |
| H2030 | 1.88 | 1.6 | P18085 | ARF4_HUMAN | ARF4 | ADP-ribosylation factor 4 | Cell migration |
| H2030 | 1.43 | 1.65 | P22061 | PIMT_HUMAN | PCMT1 | Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase | Protein methylation |
| H2030 | 1.96 | 1.43 | P31153 | METK2_HUMAN | MAT2A | S-adenosylmethionine synthase isoform type-2 | Cellular response to methionine |
| H2030 | 1.47 | 1.29 | P32119 | PRDX2_HUMAN | PRDX2 | Peroxiredoxin-2 | Cellular response to oxidative stress |
| H2030 | 1.97 | 1.55 | Q13572 | ITPK1_HUMAN | ITPK1 | Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase | Inositol trisphosphate metabolic process |
| H2030 | 1.79 | 1.62 | Q14204 | DYHC1_HUMAN | DYNC1H1 | Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 | Cytoplasmic microtubule organization |
| H2030 | 7.26 | 5.92 | Q16787 | LAMA3_HUMAN | LAMA3 | Laminin subunit alpha-3 | Cell-cell adhesion |
| H2030 | 1.16 | 1.30 | Q3MHD2 | LSM12_HUMAN | LSM12 | Protein LSM12 | RNA binding |
| H2030 | 2.93 | 3.06 | Q562R1 | ACTBL_HUMAN | ACTBL2 | Beta-actin-like protein 2 | Cell motility |
| H2030 | 3.25 | 2.17 | Q8WV24 | PHLA1_HUMAN | PHLDA1 | Pleckstrin homology-like domain family A member 1 | Apoptotic process |
| H2030 | 4.17 | 4.12 | Q8WWY8 | LIPH_HUMAN | LIPH | Lipase member H | Lipid catabolic process |
| H2030 | 2.38 | 2.53 | Q92547 | TOPB1_HUMAN | TOPBP1 | DNA topoisomerase 2-binding protein 1 | DNA metabolic process |
| H2030 | 1.29 | 1.31 | Q92572 | AP3S1_HUMAN | AP3S1 | AP-3 complex subunit sigma-1 | Golgi to vacuole transport |
| H2030 | 2.2 | 2.23 | Q96CS3 | FAF2_HUMAN | FAF2 | FAS-associated factor 2 | Proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process |
| H2030 | 1.64 | 1.21 | Q9BV40 | VAMP8_HUMAN | VAMP8 | Vesicle-associated membrane protein | Autophagosome maturation |
| | | | | | | | |
| **Cell line** | **NDR1 Log2FC** | **NDR2 Log2FC** | **Protein.Ids** | **Protein Names** | **Genes** | **Protein names** | **Biological Process (GO annotation)** |
| H2030-BrM3 | 2.64 | 3.61 | O75165 | DJC13_HUMAN | DNAJC13 | DnaJ homolog subfamily C member 13 | Regulation of early endosome to late endosome transport |
| H2030-BrM3 | 2.61 | 2.49 | P17936 | IBP3_HUMAN | IGFBP3 | Insulin-like growth factor-binding protein 3 | Regulation of cell growth |
| H2030-BrM3 | 2,00 | 1.68 | P52209 | 6PGD_HUMAN | PGD | 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating | Pentose biosynthetic process |
| H2030-BrM3 | 2.01 | 1.65 | Q86UL3 | GPAT4_HUMAN | GPAT4 | Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4 | Diacylglycerol metabolic process |
| H2030-BrM3 | 1.92 | 1.41 | Q8IXB1 | DJC10_HUMAN | DNAJC10 | DnaJ homolog subfamily C member 10 | Protein folding in endoplasmic reticulum |
| H2030-BrM3 | 2.12 | 2.09 | Q92526 | TCPW_HUMAN | CCT6B | T-complex protein 1 subunit zeta-2 | Protein folding |
| H2030-BrM3 | 1.45 | 1.52 | Q96CM3 | RUSD4_HUMAN | RPUSD4 | Pseudouridylate synthase RPUSD4, mitochondrial | mRNA processing |
| H2030-BrM3 | 5.99 | 5.99 | Q9NS37 | ZHANG_HUMAN | CREBZF | CREB/ATF bZIP transcription factor | Integrated stress response signaling |
| H2030-BrM3 | 1.88 | 1.62 | Q9NYY8 | FAKD2_HUMAN | FASTKD2 | FAST kinase domain-containing protein 2, mitochondrial | Apoptotic process |

La réalisation de l'interactome de la kinase NDR2 nous a permis d'identifier des partenaires spécifiques de cette kinase, absents de l'interactome de NDR1 qui, contrairement à NDR2, est plutôt un suppresseur de tumeur. À la suite de cette analyse, nous avons choisi de nous concentrer sur le rôle potentiel de NDR2 dans le trafic vésiculaire, et plus particulièrement dans l'autophagie. Ce choix a été motivé par l'identification de la protéine ATG9A (Autophagy Related 9A), qui non seulement est impliquée dans les premières étapes de l'autophagie, mais présente également le motif consensus de phosphorylation reconnu par NDR2.

# Résultats Partie III

NDR2 régule la migration des cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules en cas de famine en soutenant la biogenèse des autophagosomes par la régulation de LC3 et d'ATG9A

# I – Autophagie

## A. Généralités

Le terme autophagie provient du grec *auto* (« soi-même ») et *phagein* (« manger »), signifiant littéralement « se manger soi-même ». L'autophagie est un processus catabolique fondamental, hautement conservé chez les eucaryotes, qui permet la dégradation et le recyclage de composants intracellulaires, tels que des organites endommagés, des agrégats protéiques ou des portions de cytoplasme, *via* le système lysosomal. Contrairement au protéasome, limité à la dégradation de protéines solubles, l'autophagie est la seule voie capable d'éliminer des structures cellulaires complexes à grande échelle, jouant ainsi un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

En réponse à des stress, notamment la privation nutritionnelle, l'autophagie soutient la survie cellulaire en réutilisant les constituants non essentiels pour préserver les niveaux énergétiques. Elle participe également à l'élimination d'éléments cytotoxiques, à la régulation du métabolisme, à l'immunité, à l'inflammation et au maintien des cellules souches. Des altérations de ce processus sont impliquées dans diverses pathologies telles que les maladies neurodégénératives, le cancer ou encore le vieillissement (Levine & Kroemer, 2008; Eskelinen, 2019).

Historiquement, l'autophagie a été observée pour la première fois par microscopie électronique dans les années 1950, avant d'être formellement nommée par Christian de Duve en 1963, dans le contexte des recherches sur les lysosomes, découvertes qui lui ont valu le prix Nobel en 1974. Les étapes clés de sa caractérisation morphologique (autophagosome, phagophore, amphisome) ont été définies dans les décennies suivantes.

Le tournant majeur survient dans les années 1990 grâce aux travaux de Yoshinori Ohsumi, qui identifie les gènes ATG chez la levure, marquant le début de l'élucidation mécanistique du processus. Cette découverte, qui révèle le caractère universel de l'autophagie chez les eucaryotes, lui vaudra le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2016.

Au cours des deux dernières décennies, la compréhension du processus autophagique s'est considérablement approfondie par des avancées majeures dans l'identification de ses composants moléculaires**,** la dissection de ses voies de régulation, ainsi que l'élucidation de ses implications dans divers processus physiologiques et pathologiques**.**

## B. Les différents types d'autophagies

### 1) Microautophagie

La microautophagie est un processus catabolique au cours duquel des portions du cytoplasme sont directement internalisées par la membrane du lysosome chez les mammifères sans intervention d'autophagosomes (W. Li et al., 2012). C'est un mécanisme à la fois non sélectif, impliquant une élimination aléatoire de composant cytoplasmique, et sélectif, ciblant des structures spécifiques telles que les noyaux, mitochondries, les peroxysomes ou encore les gouttelettes lipidiques.

Deux mécanismes distincts ont été décrits chez les mammifères (*Figure 17*) :

- Invagination de la membrane lysosomale, formant des tubes autophagiques. Ce mécanisme est dépendant du complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), et du complexe ATG8/ATG12 (Autophagy-related 8 /12).
- Protrusion de la membrane lysosomale, impliquant les protéines ATG centrales ainsi que les protéines de fusion membranaire de la famille SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor).

Un mécanisme apparenté à l'invagination lysosomale, désigné sous le nom de microautophagie endosomale, a été mis en évidence chez les mammifères. Ce processus repose sur l'invagination de la membrane des endosomes tardifs ou des corps multivésiculaires (MVB), conduisant à la séquestration en masse ou ciblée de protéines cytosoliques. La fusion ultérieure de l'endosome tardif ou du MVB avec les lysosomes amène à la dégradation et au recyclage des composants cytoplasmiques (Sahu et al., 2011) (*Figure 17*).

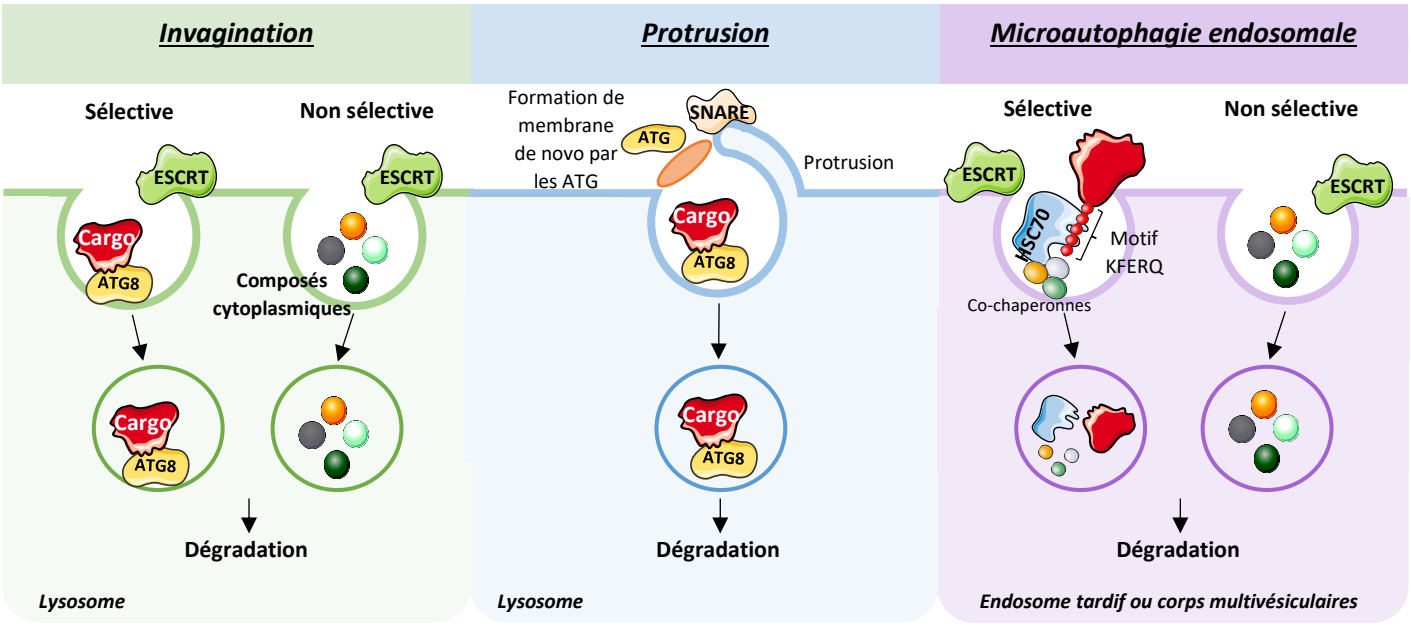



***Figure 17 : Microautphagie***

*La microautophagie par invagination peut être sélective via la reconnaissance d'un cargo spécifique à dégrader par ATG8 ou non spécifique par l'invagination aléatoire d'une portion du cytoplasme. Ces processus nécessitent les protéines ESCRT pour la fission membranaire, permettant la dégradation lysosomale. La microautophagie par protrusion consiste à l'extension de la membrane lysosomale pour former une protrusion permettant la séquestration de protéines spécifiques. La fermeture nécessite la formation de membrane par les protéines ATG et du complexe SNARE, permettant ainsi l'internalisation du cargo à dégrader et sa dégradation.*

*La microautophagie endosomale non sélective séquestre une portion des composants cytoplasmiques par une invagination se formant à la surface d'un endosome tardif grâce à la fonction coordonnée de ESCRT et de protéines accessoires. La microautophagie endosomale sélective cibles des protéines spécifiques comportant le motif KFERQ reconnue par les protéines chaperonne HSC70 et co-chaperonnes qui vont se fixer à la membrane endosomale qui sont ensuite internalisés pour être dégradés (daprès Li et al., 2012 ; Sahu et al., 2011).*

### 2) Autophagie dépendante des chaperonnes (CMA)

La CMA est un processus d'autophagie sélective impliquée dans la dégradation de protéines spécifiques. Les protéines ciblées sont transloquées directement dans la lumière du lysosome pour y être dégradées. Ce processus repose sur une reconnaissance sélective : tous les substrats de la CMA possèdent un motif pentapeptidique spécifique, KFERQ, qui est reconnu par la machinerie cellulaire (Dice, 1990). Environ 30 % des protéines cytosoliques contiendraient ce motif de ciblage (Chiang & Dice, 1988). La CMA semble être exclusive aux mammifères et aux oiseaux (Mizushima & Komatsu, 2011).

Le mécanisme de la CMA repose sur une série d'étapes bien définies. La protéine chaperonne HSC70 reconnaît les protéines contenant le motif KFERQ et forme un complexe avec d'autres co-chaperonnes. Ce complexe interagit ensuite avec la queue C-terminale de la protéine LAMP2A (lysosome-associated membrane protein type 2A), localisée sur la face cytosolique de la membrane lysosomale (Tekirdag & Cuervo, 2018). Cette interaction déclenche la multimérisation de LAMP2A, formant un canal de translocation permettant le dépliement et la linéarisation du substrat, nécessaire à son passage à travers la membrane. Une fois dans la lumière lysosomale, la protéine est dégradée par les hydrolases lysosomales (Cuervo & Dice, 2000; Tekirdag & Cuervo, 2018), LAMP2A est détachée du substrat et recyclée à la membrane lysosomale pour initier un nouveau cycle de la CMA (Dice, 2007; Kaushik et al., 2006; Q. Yang et al., 2019) (*Figure 18*).

La régulation de la CMA repose principalement sur la disponibilité de LAMP2A à la membrane lysosomale, régulée non pas par sa synthèse, mais par sa stabilité et son organisation au niveau de la membrane (Bandyopadhyay et al., 2008; Cuervo & Dice, 2000).

Fonctionnellement, la CMA est activée en réponse à des stress cellulaires tels qu'un stress oxydatif modéré, l'accumulation de protéines endommagées, ou lors de jeûnes prolongés (Parzych & Klionsky, 2014). Elle intervient aussi dans le métabolisme, la régulation transcriptionnelle et l'immunité (Yao & Shen, 2023). En situation de privation nutritive, la macroautophagie est initialement activée pour dégrader les protéines et les lipides. Au-delà de cinq heures de jeûne, la CMA prend le relais pour fournir des acides aminés recyclés nécessaires à la synthèse protéique, et peut rester active jusqu'à trois jours (Tekirdag & Cuervo, 2018).

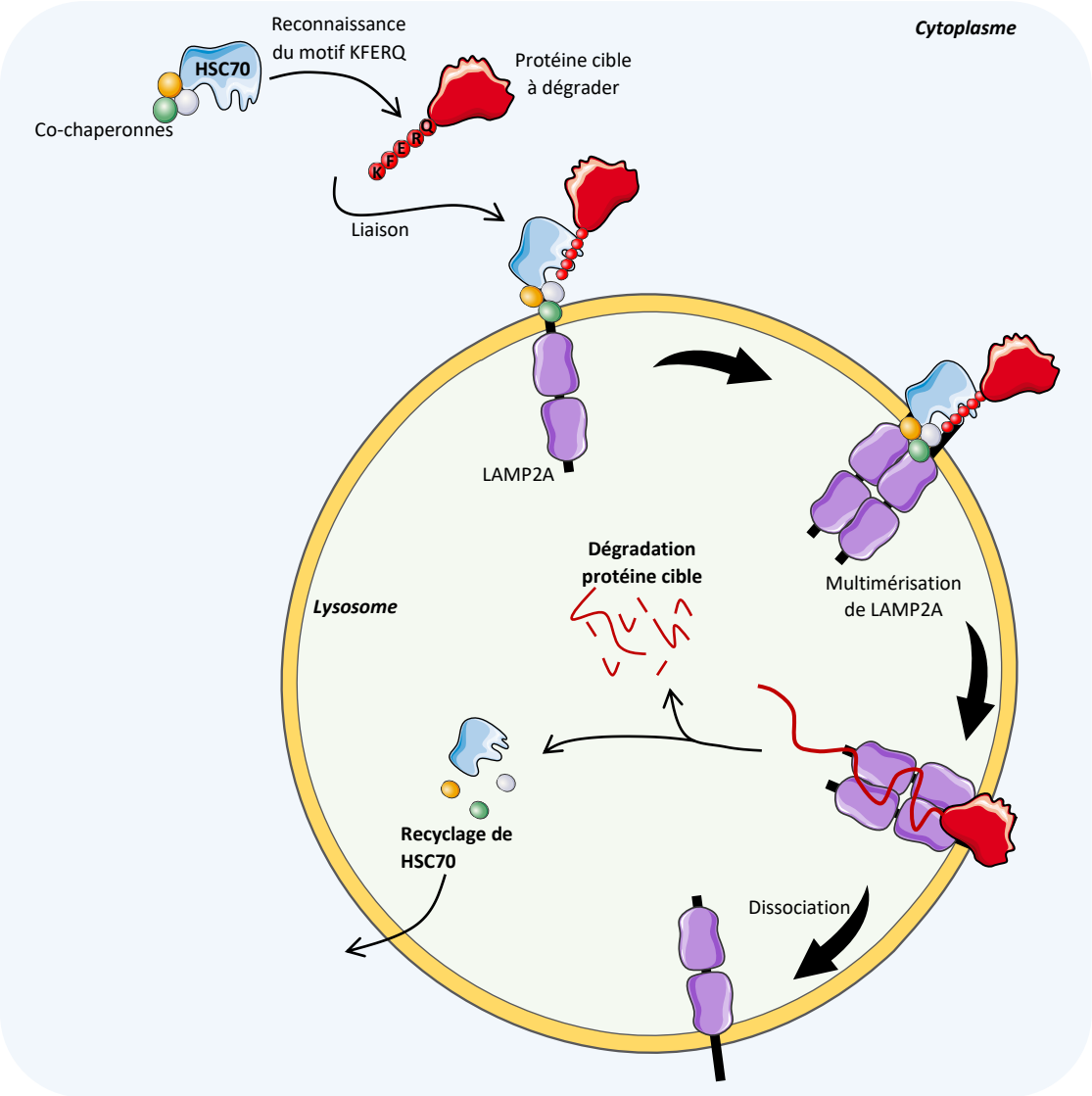



***Figure 18 : Autophagie médiée par les chaperonnes (CMA)***

*Lors de la CMA les protéines ciblées possèdent le motif KFERQ, permettant leur reconnaissance par la protéine chaperonne HSC70 qui induit la fixation à la protéine LAMP2A présente sur le lysosome. LAMP2A se multimérise conduisant au dépliement de la protéine cible et son internalisation dans le lumen par y être dégradée. Le complexe de LAMP2A se dissocie et HSC70 est recyclée dans le cytoplasme (adapté de Kaushik & Cuervo, 2018).*

### 3) Macroautophagie

La macroautophagie, ci-après désignée par le terme autophagie, constitue la forme de dégradation lysosomale la plus largement caractérisée et étudiée à ce jour. Environ 37 protéines ATG ont été identifiées chez la levure bien que moins de la moitié d'entre elles seraient impliquées dans le processus d'autophagie canonique (Tsukada & Ohsumi, 1993; Z. Yang & Klionsky, 2010; Ohsumi, 2014). Ce mécanisme demeure hautement conservé au sein de l'évolution, puisqu'environ 15 de ces gènes *ATG* possèdent des homologues fonctionnels chez les mammifères, témoignant de l'importance évolutive de ce processus dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Klionsky et al., 2003; Nakatogawa et al., 2009).

Les protéines ATG interviennent de manière indépendante ou en complexes multiprotéiques à différentes étapes du processus autophagique. L'autophagie se caractérise par la séquestration de portions du cytoplasme, contenant divers composés, au sein d'une structure à double membrane appelée phagophore. Ce dernier s'élargit progressivement pour former un autophagosome, vésicule close capable d'englober les constituants cytoplasmiques à dégrader. L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome, donnant naissance à un autolysosome dans lequel les substrats sont dégradés par des hydrolases lysosomales. Les produits de cette dégradation sont ensuite libérés dans le cytosol, où ils peuvent être recyclés par la cellule pour la biosynthèse de macromolécules ou la production d'énergie.

Le processus autophagique se divise en cinq étapes principales (*Figure 19*) :

- **Initiation** : activation des voies de signalisation induisant l'autophagie par des complexes protéiques dans la zone périnucléaire, près du RE.
- **Nucléation** : formation de la membrane isolante : le phagophore.
- **Élongation** : expansion du phagophore en une structure vésiculaire fermée à double membrane, l'autophagosome, incluant les substrats à dégrader.
- **Fusion** : interaction et fusion de l'autophagosome avec un lysosome pour former l'autolysosome.
- **Dégradation** : dégradation enzymatique du contenu autophagique, suivie du recyclage des métabolites libérés.

L'autophagie peut être non sélective, c'est-à-dire impliquant la capture aléatoire de composants cytoplasmiques, ou sélective, ciblant spécifiquement des éléments intracellulaires endommagés ou superflus, tels que des organites (mitochondries,

peroxysomes), des agrégats protéiques, des acides nucléiques ou de larges complexes protéiques. Bien que le mécanisme soit similaire dans les deux cas, l'autophagie sélective se distingue par la reconnaissance spécifique de cargaison. C'est un processus dynamique au cours duquel les autophagosomes sont produits puis dégradés suite à leur fusion avec les lysosomes, cela est appelé le flux autophagique.

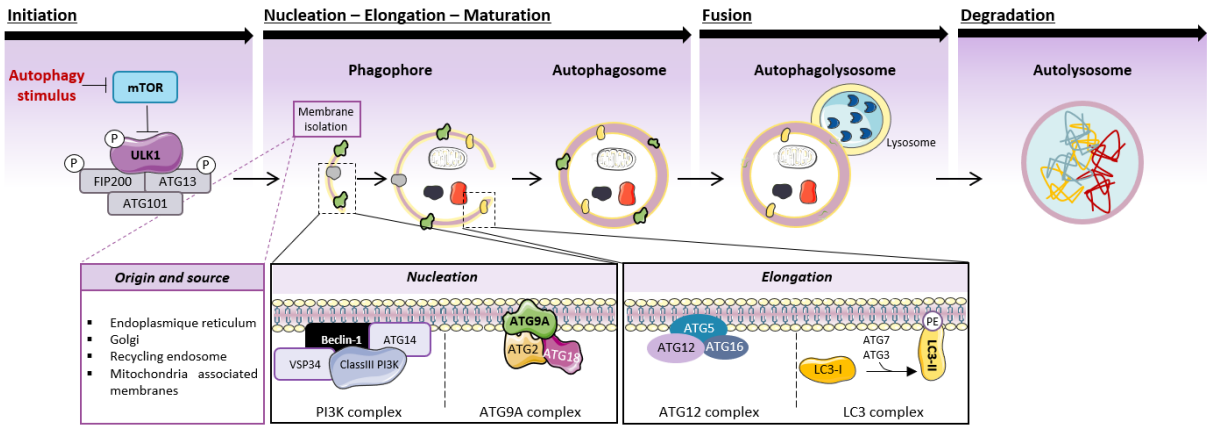



***Figure 19 : les différentes étapes de l'autophagie chez les mammifères***

*L'autophagie est un processus cellulaire dynamique composé d'une succession d'étapes aboutissant à la dégradation et/ou au recyclage de composants cytoplasmiques. Elle débute par une phase d'initiation, généralement déclenchée par un stimulus tel que la privation de nutriments, entraînant l'inhibition du complexe mTORC1. Cette inhibition libère l'activité du complexe ULK1, amorçant ainsi le processus autophagique.*
*La phase suivante comprend la nucléation et l'élongation, au cours desquelles se forme le phagophore, une structure membranaire en expansion. La nucléation s'appuie sur diverses sources membranaires (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, endosomes de recyclage, membranes mitochondriales), ainsi que sur le complexe PI3KC3 et la protéine ATG9A, indispensables à la formation du phagophore.*
*Le phagophore s'élargit progressivement, englobant les composants cytoplasmiques à dégrader, puis se referme pour former un autophagosome, marquant l'étape de maturation. L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome, donnant naissance à un autolysosome. C'est dans ce compartiment que les cargaisons séquestrées sont dégradées par des enzymes lysosomales, permettant leur recyclage au profit de la cellule.*

### 3.1) Induction et initiation de l'autophagie

Un niveau basal d'autophagie est indispensable au bon fonctionnement cellulaire, permettant l'élimination et le recyclage des organites endommagés ainsi que des protéines défectueuses. Ce processus contribue activement au maintien de l'équilibre fonctionnel et à l'homéostasie. De nombreux facteurs induisent et influencent la dynamique du flux autophagique notamment l'état nutritionnel, un stress oxydatif, les signaux hormonaux, la température, l'hypoxie, ou encore les infections microbiennes (Mizushima, 2007; Kroemer et al., 2010;

Watanabe et al., 2023). L'autophagie permet de mobiliser des ressources intracellulaires pour restaurer le pool énergétique nécessaire à la survie cellulaire (Kroemer et al., 2010). Cette régulation précise met en évidence le rôle essentiel de l'autophagie dans la capacité des cellules à s'adapter à leur environnement.

Chez les mammifères, la formation des autophagosomes commence au niveau du RE, notamment dans les domaines associés aux mitochondries (sites de contact RE-mitochondries). La biogenèse du précurseur de l'autophagosome au niveau de ces sites d'initiation nécessite l'interaction de multiples protéines ATG et des diverses sources membranaires impliquant des interaction complexes, détailler ci-après.

**Le complexe ULK**

L'induction de l'autophagie chez les mammifères est principalement régulée par la modulation du complexe ULK. Ce complexe est constitué de ULK1 ou ULK2 (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1/2), d'ATG13, de la protéine FIP200 (Focal Adhesion Kinase Family-Interacting Protein de 200 kDa) et d'ATG101 (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009; Mercer et al., 2009). ATG101 interagit directement avec ULK1 *via* sa liaison à ATG13, et joue un rôle essentiel dans l'activation de l'autophagie (Z. Yang & Klionsky, 2010). Les rôles spécifiques des kinases ULK1 et ULK2, sont longtemps restés mal définis, en raison de leur forte homologie de séquence et d'une supposée redondance fonctionnelle. Toutefois, des études ont montré que ULK1 joue un rôle prépondérant dans l'initiation de l'autophagie en réponse à la privation nutritionnelle, notamment dans les cellules HEK293, où son activation induit la lipidation de LC3, un marqueur clé de l'autophagie, ce qui ne serait pas le cas d'ULK2 (Chan et al., 2007, 2009). ULK2 semble, quant à lui, exercer un rôle compensatoire selon le type tissulaire. Des analyses *in silico* suggèrent que ces deux kinases sont impliquées dans diverses formes d'autophagie sélectives, telles que la mitophagie, l'aggrephagie et la xénophagie (Fuqua et al., 2019; Demeter et al., 2020).

L'implication d'ATG13, FIP200 et ATG101 est nécessaire à l'activation et au bon positionnement de ULK au niveau du site d'initiation afin d'induire son activité kinase maximale (Ganley et al., 2009). L'activation fonctionnelle du complexe ULK dépend de l'interaction avec ses cofacteurs (*Figure 20*) :

- ATG13 stabilise et active ULK, entraînant la phosphorylation et l'activation de FIP200 et d'ATG101 (Jung et al., 2009),

- FIP200 facilite le recrutement du complexe,
- ATG101 protège ATG13 de la dégradation (Hosokawa et al., 2009 ; Mercer et al., 2009).

ULK1 et ATG13 présentent des domaines de liaison aux lipides favorisant leur recrutement aux membranes courbées du réticulum endoplasmique, un site privilégié pour l'initiation du phagophore (E. Y. W. Chan et al., 2009; Karanasios et al., 2013).

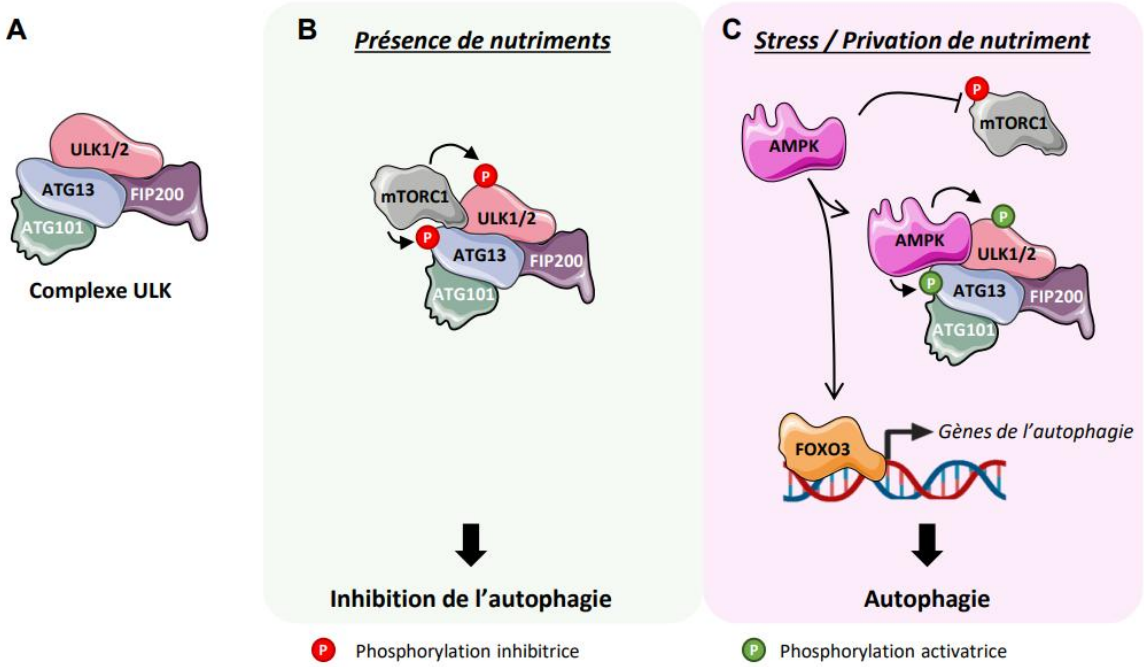



***Figure 20 : Structure et régulation du complexe ULK chez les mammifères***

*(A) Le complexe ULK, essentiel à l'initiation de l'autophagie, est constitué de ULK1 ou ULK2, ATG13, FIP200 et ATG101. ULK1/2 possède une activité kinase en N-terminal, permettant son auto-phosphorylation ainsi que celle d'ATG13 et FIP200. ATG101 stabilise le complexe via son interaction avec ATG13 et potentialise son activité.*

*(B) En conditions riches en nutriments, mTORC1 inhibe le complexe ULK par phosphorylation de ULK1/2 et ATG13. En réponse au stress énergétique, inhibant alors l'autophagie. (C) AMPK inhibe mTORC1 via la phosphorylation de Raptor et active ULK1/2 directement, favorisant ainsi le déclenchement de l'autophagie. AMPK facilite l'activité transcriptionnelle de FOXO3, induisant l'expression de gènes de l'autophagie et l'induction de l'autophagie.*

L'état de phosphorylation du complexe ULK est un facteur central dans la régulation de l'autophagie. Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés sur ULK1 et ATG13. La régulation de ces sites dépend de l'activité de deux kinases majeures : mTORC1 (Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1) et AMPK.

La kinase mTOR agit au sein du complexe mTORC1 (composé de mTOR, Raptor, mLST8). En conditions riches en nutriments, mTORC1 est activé et se localise au niveau de la membrane

lysosomale et de l'endosome tardif (Carroll et al., 2017). Dans cette configuration, mTORC1 se lie au complexe ULK1, entraînant la phosphorylation inhibitrice de ULK1 (Ser 757) et d'ATG13 (Ser 258), bloquant l'initiation de l'autophagie (Ganley et al., 2009; Puente et al., 2016). Cette phosphorylation de ULK1 par mTORC1 affecte son interaction avec AMPK inhibant l'autophagie (J. Kim et al., 2011) (*Figure 20*).

En situation de stress ou de privation en nutriments, mTORC1 est inactivé, induisant sa dissociation du complexe ULK. Cela favorise la relocalisation d'ULK1 aux membranes autophagiques, son activation, son autophosphorylation ainsi que la cascade autophagique.

La kinase AMPK, un autre senseur énergétique, est activée en réponse à un stress métabolique ou à une privation nutritionnelle. Une élévation du taux d'AMP active AMPK, inhibant mTORC1 (Inoki et al., 2003, 2003; Gwinn et al., 2008; Carroll et al., 2017), entrainant ainsi l'activation de l'autophagie. AMPK agit à plusieurs niveaux : en phosphorylant Raptor ce qui inhibe mTORC1 ; activant le facteur de transcription FOXO3, impliqué dans l'expression de gènes autophagiques ; et phosphorylant et activant ULK1 (Ser 317, 555, 777 et 467) et ATG13 (Ser 224) (J. Kim et al., 2011; Egan et al., 2011; Puente et al., 2016).

Ce mécanisme permet ensuite à ULK1 de s'autophosphoryler (Thr180) (Lazarus et al., 2015), ainsi que de phosphoryler ATG13 (Ser 318) et FIP200 (Ser 943, 986 et 1323) (Egan et al., 2011; Joo et al., 2011), renforçant ainsi l'activation complète du complexe et l'initiation efficace de la cascade autophagique. Toutefois, l'implication de ces phosphorylations dans l'activation de l'autophagie n'est pas très bien comprise.

La régulation post-traductionnelle de ULK1 implique aussi des modifications par acétylation. En condition de privation de facteur de croissance, GSK3 est activée et phosphoryle l'acétyletransférase TIP60 qui acétyle ensuite ULK1 (Lys162 et Lys606) entrainant son activation et celle de l'autophagie (S.-Y. Lin et al., 2012; Ryu et al., 2021).

**Le complexe PI3K de classe III**

Le complexe PI3K de classe III (PI3KC3, aussi appelé complexe Beclin 1) est essentiel pour l'initiation et la formation des autophagosomes. PI3KC3 est composé de VPS34 (Vacuolar Protein Sorting 34, kinase lipidique), de VPS15/p150 (sous-unité régulatrice), de Beclin-1 et de ATG14L (Nishimura & Tooze, 2020). VPS34 et VPS15 favorisent la stabilité et l'activité catalytique, Beclin-1 et ATG14L participent au recrutement de la machinerie autophagique au RE et à la détection de la courbure membranaire (Matsunaga et al., 2010).

En cas de famine, ATG14L recrute le complexe PI3KC3 vers l'omégasome dérivé du RE. En effet, le coté C-terminale d'ATG14L contient une séquence de ciblage de l'autophagosome nécessaire au recrutement du complexe PI3KC3 et à l'initiation de l'autophagie (Matsunaga et al., 2010).

L'activation du complexe PI3KC3 est finement régulée. En effet, le complexe ULK1 est capable de phosphoryler Beclin-1 sur la sérine 14, engendrant l'activation de VPS34 et assure un bon assemblage du complexe (Russell et al., 2013). ULK1 peut également phosphoryler Beclin-1 aux sérines 15 et 30, notamment en présence d'ATG14L. De plus, ULK1 phosphoryle AMBRA1 (Autophagy and Beclin-1 regulator 1), une protéine d'échafaudage spécifique aux mammifères, qui interagit avec Beclin-1. Cette phosphorylation facilite la relocalisation du complexe PI3KC3 vers le site d'initiation de l'autophagie (Di Bartolomeo et al., 2010; Park et al., 2018).

En outre, AMPK phosphoryle Beclin-1 sur les sérines 91 et 94, renforçant ainsi la stabilité et l'activité du complexe PI3KC3 (J. Kim et al., 2013). Ces modifications facilitent le ciblage membranaire de PI3KC3 et stimule l'activité kinase de VPS34, entraînant la production de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) au niveau du site d'initiation du phagophore. La génération de PI3P est une étape cruciale de l'initiation et de la nucléation du phagophore, car elle recrute les protéines WIPI1/2(WD repeat domain phosphoinositide-interacting), qui, à leur tour, favorisent le recrutement des protéines ATG8/LC3-PE (phosphatidyléthanolamine), nécessaires à l'élongation membranaire (Dooley et al., 2014).

Un autre mécanisme régule la localisation et l'activité du complexe PI3KC3. Le complexe moteur Dyneine séquestre Beclin-1 au niveau des microtubules *via* l'interaction entre Beclin-1 et AMBRA1. Lors de l'induction de l'autophagie, la phosphorylation de AMBRA1 par ULK1 libère Beclin-1des microtubules, facilitant ainsi la translocation du complexe PI3KC3 et d'AMBRA1 vers le réticulum endoplasmique, initiant l'autophagie (Di Bartolomeo et al., 2010).

Toutefois, d'autres protéines interviennent également dans la régulation de Beclin-1 et dans l'activation du processus autophagique. Beclin-1 est une protéine multi-domaine, lui conférant la capacité d'interagir avec divers partenaires *via* ses différents domaines, générant ainsi des effets pro- ou anti-autophagiques (Menon & Dhamija, 2018).

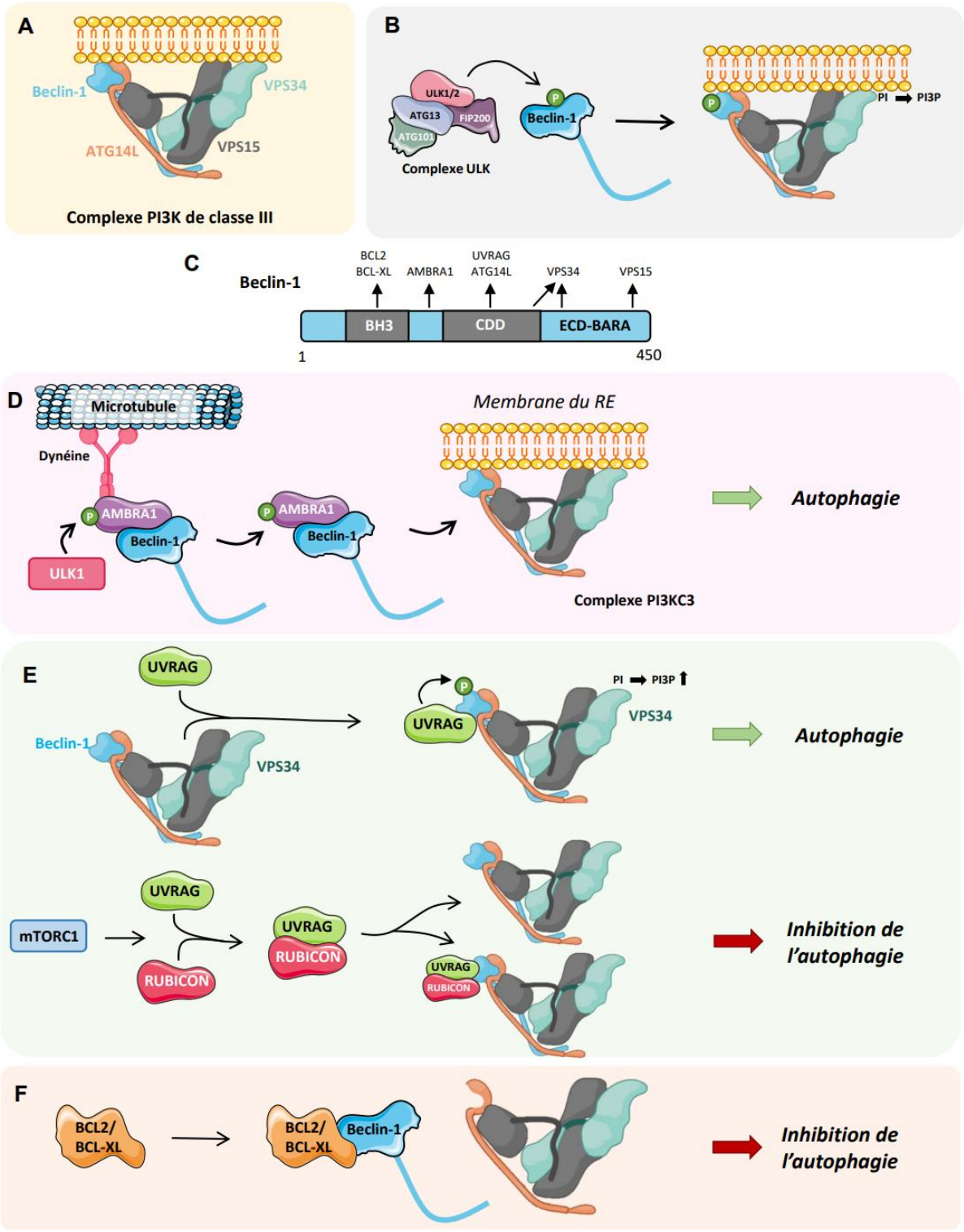



***Figure 21 : Structure et activation du complexe PI3KC3***

*(A) Le complexe PI3KIII des mammifères comprenant VPS34 (la kinase lipidique), VPS15, Beclin-1 et ATG14L. VPS34 et VPS15, forme une structure en forme de « V » interagissant avec Beclin-1et ATG14L. (B) L'activation du complexe est renforcée par la phosphorylation de Beclin-1par ULK1, ce qui stimule la production de PI3P à partir de PI, un événement clé de l'initiation autophagique.*

*Régulation de PI3KC3 par les partenaires de Beclin-1. (C) Structure de Beclin-1 et ces différents domaines fonctionnels : BH3 (interaction avec BCL2/BCL-XL), hélice flexible (liaison AMBRA1), domaine central (interaction avec VPS34, ATG14L, UVRAG, RUBICON), et domaine BARA (ancrage au complexe). (D) En condition de nutriment, le complexe AMBRA1-Beclin-1 est lié à la dynéine et reste inactif. En carence nutritionnelle, ULK1 phosphoryle AMBRA1, libérant Beclin-1 qui rejoint les membranes du RE, activant VPS34. (E) UVRAG se lie à Beclin-1 stimulant VPS34 permettant la production de PI3P et induire l'autophagie. RUBICON séquestre UVRAG médiée par mTORC1, diminuant l'autophagie. (F) BCL2/BCL-XL empêche l'activation de Beclin-1 par formation de dimères inactifs, bloquant l'association avec le complexe PI3K et l'autophagie.*

La protéine UVRAG (*UV radiation resistance associated gene*) interagit avec le domaine CCD de Beclin-1 et renforce l'activité kinase de VPS34, favorisant ainsi les fonctions pro-autophagiques (C. Liang et al., 2008). UVRAG joue également un rôle dans les étapes tardives de l'autophagie, en facilitant la fusion des autophagosomes matures avec les lysosomes. Il est intéressant de noter que UVRAG semble agir de manière indépendante de ATG14L, ces deux protéines étant en compétition pour le même site de liaison sur Beclin-1.

Cependant, UVRAG peut interagir avec la protéine RUBICON ce qui inhibe l'autophagie, interaction renforcée par mTORC1 ( Matsunaga et al., 2010; Kim et al., 2015). RUBICON peut également se lier à Beclin-1 réprimant la maturation des autophagosomes (Sun et al., 2015).

Enfin, les protéines BCL2 et BCL-XL, qui en interagissant avec le domaine BH3 de Beclin-1, empêchent son association avec VPS34, inhibant ainsi la biogenèse des autophagosomes (Pattingre et al., 2005). Ce mécanisme constitue un frein important à l'autophagie dans des contextes cellulaires spécifiques.

Ces interactions témoignent de la régulation complexe et dynamique du processus autophagique, où un équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs conditionne la progression ou l'arrêt du processus.

### 3.2) Nucléation du phagophore

Suite à leur activation, les complexes ULK et PI3KC3 sont recrutés sur le site d'initiation du phagophore, localisé dans une région spécifique du RE (Wirth et al., 2013). Le complexe PI3KC3 catalyse la production de phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P), dont l'accumulation au niveau de la membrane du RE initie la phase de nucléation. Cette étape induit la formation d'une structure membranaire transitoire riche en PI3P, appelée omégasome. Le détachement de l'omégasome conduit à la formation du phagophore et son élongation (Carlsson & Simonsen, 2015; Hurley & Young, 2017). L'enrichissement en PI3P favorise le recrutement de protéines effectrices spécifiques, telles que DFCP1 (double FYVE-containing protein 1) et les membres de la famille WIPI qui participent à l'étape de nucléation. Ces protéines forment une plateforme protéique essentielle à l'élongation de la membrane du phagophore (Polson et al., 2010) (*Figure 22*).

La famille des protéines WIPI comprend quatre membres : WIPI1 à WIPI4. Parmi eux, WIPI1 et WIPI2 sont directement impliquées dans la phase de nucléation, tandis que WIPI4 intervient

principalement au cours de la maturation des autophagosomes (Proikas-Cezanne et al., 2015). WIPI1 interagit avec le PI3P, interaction indispensable à la conjugaison de la protéine LC3 à la PE, un mécanisme essentiel pour l'élongation du phagophore (Mauthe et al., 2011). WIPI2 joue également un rôle aussi important dans ce processus en facilitant la lipidation de LC3 par le recrutement de ATG16L du complexe ATG5–ATG12–ATG16L (Dooley et al., 2014; Proikas-Cezanne et al., 2015). Les fonctions de WIPI1 et WIPI2 dans la nucléation de la membrane autophagosomale ont été démontrées dans des conditions de privation nutritionnelle (Mauthe et al., 2011). Toutefois, leur implication n'a pas pu être confirmée lors d'une induction de l'autophagie par privation en glucose, suggérant que ce type d'activation pourrait se dérouler de manière indépendante de la production de PI3P (McAlpine et al., 2013). Alors que la suppression de WIPI4 dans les cellules rénales de reins normaux entraîne leur accumulation, la déplétion de WIPI2 dans les cellules HEK293 empêche la formation d'autophagosomes. Ces résultats suggèrent que WIPI4 joue un rôle différent de WIPI1 et WIPI2 dans la régulation du processus autophagique.

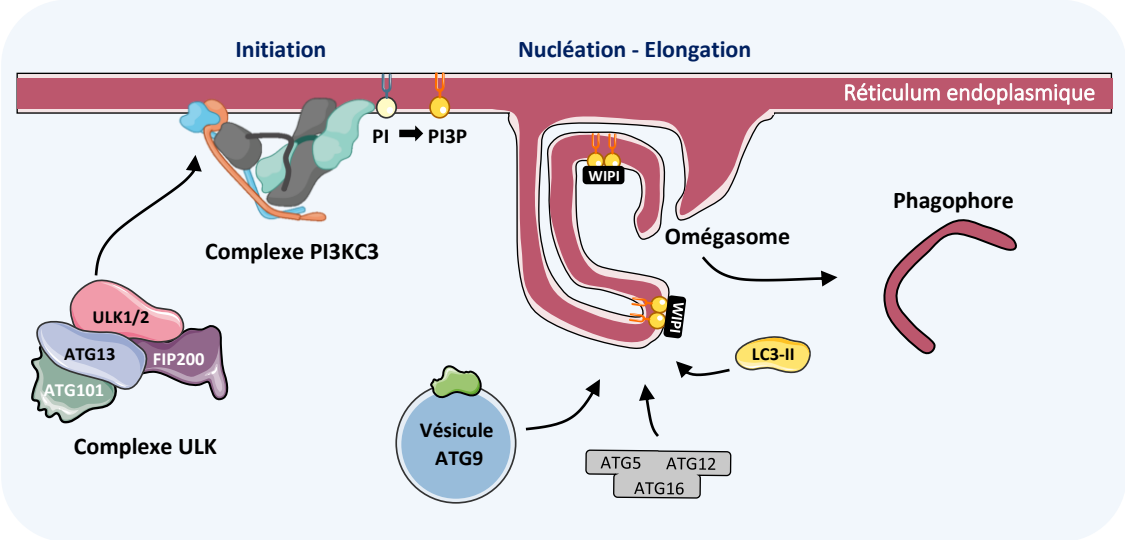



***Figure 22 : Étapes clés de la formation du phagophore***

*L'initiation du phagophore commence par l'activation du complexe ULK, qui stimule le complexe PI3KC3, induisant la production de PI3P au niveau d'omégasomes, structures spécialisées du réticulum endoplasmique.*

*Le PI3P recrute les protéines WIPI, qui servent de plateformes pour l'ancrage du complexe ATG12–ATG5–ATG16L1, essentiel à l'élongation membranaire.*

*Les vésicules ATG9A apportent les lipides nécessaires à cette expansion, tandis que l'incorporation de LC3-II à la membrane permet la croissance et la fermeture du phagophore, aboutissant à la formation d'un autophagosome fonctionnel (d'après Polson et al., 2010 ; Hurley & Young, 2017).*

### 3.3) Elongation du phagophore

La formation de l'autophagosome repose sur une série d'événements coordonnés impliquant des protéines ATG clés. L'un des complexes essentiels est ATG12–ATG5–ATG16L1, formé par la conjugaison d'ATG12 à ATG5, catalysée par les enzymes de type E1 (ATG7) et E2 (ATG10). Ce complexe s'associe à ATG16L1, formant un complexe trimérique qui joue un rôle fondamental dans l'élongation de la membrane d'isolation en facilitant la lipidation des protéines de la famille ATG8, notamment LC3**,** GATE16 et GABARAP (Hanada et al., 2007; Fujita et al., 2008; Mauthe et al., 2011; Mizushima & Komatsu, 2011).

Le système ATG12 est recruté au phagophore grâce à l'interaction entre WIPI2 (protéine liant le PI3P) et ATG16L1 (Polson et al., 2010 ; Dooley et al., 2014) (*Figure 22*). Sur place, il agit comme une ligase de type E3, catalysant la conjugaison de LC3 à la PE**,** un processus qui permet l'ancrage de LC3 (sous sa forme lipidée, LC3-II) à la membrane autophagosomale (*Figure 23*).

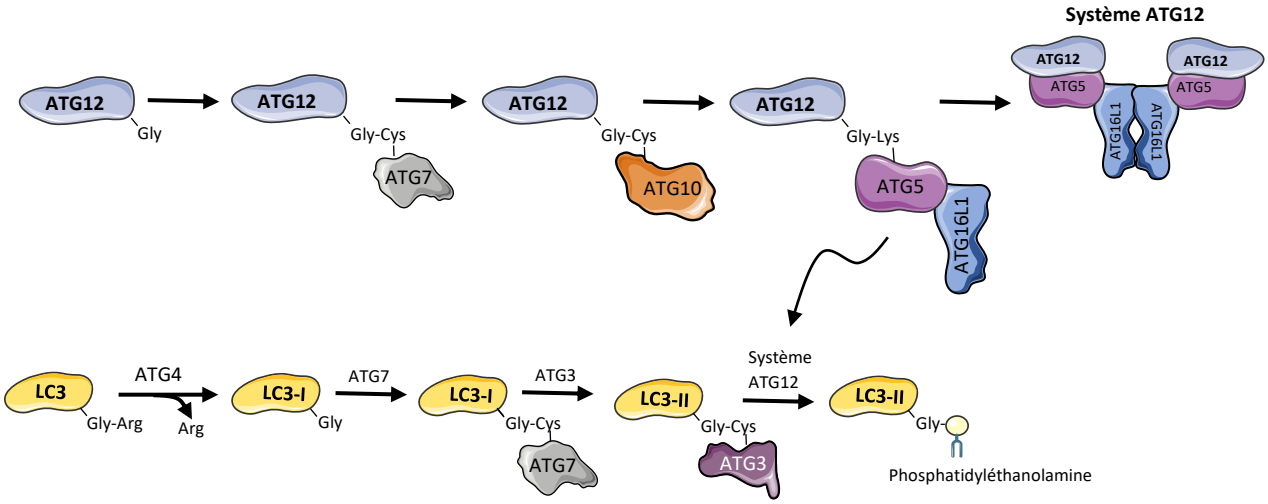



***Figure 23 : Les deux systèmes de conjugaison de type ubiquitine impliqués dans l'autophagie (ATG12 et LC3)***

*Lors de l'élongation du phagophore, deux systèmes enzymatiques de type ubiquitine permettent la formation de complexes clés.*

*(En haut) Le premier système conjugue ATG12 à ATG5 via les enzymes de type E1 (ATG7) et E2 (ATG10). Le complexe ATG12–ATG5 interagit ensuite avec ATG16L1 pour former le complexe ternaire ATG12–ATG5–ATG16L1, qui peut s'homodimériser et former le système ATG12.*

*(En bas) Le second système modifie LC3 : après un clivage par ATG4, le pro-LC3 devient LC3-I. Celui-ci est activé par ATG7 (E1-like), transféré à ATG3 (E2-like), puis conjugué à la phosphatidyléthanolamine (PE) avec l'aide du complexe ATG12–ATG5–ATG16L1 (fonction E3-like), formant LC3-II (d'après Kabeya et al., 2004 ; Polson et al., 2010 ; Dooley et al., 2014*).

Ce processus commence par le clivage de LC3 par la protéase ATG4, qui expose un résidu glycine à l'extrémité C-terminale de la protéine. Ensuite, ATG7 et ATG3 assurent la conjugaison de LC3 à la PE (Ichimura et al., 2000; Kabeya et al., 2004) permettant sa fixation à la membrane (*Figure 23*). Une fois ancré, LC3-II joue un rôle dans l'expansion membranaire**,** la sélection du cargo, ainsi que la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Nakatogawa, 2013; Slobodkin & Elazar, 2013).

Au cours de l'expansion du phagophore, la majorité des protéines ATG se dissocient progressivement de la membrane, à l'exception notable de la protéine LC3 et de ses homologues. Ces derniers restent associés à la membrane, en particulier à la face interne de l'autophagosome une fois celui-ci fermé, ce qui confère à la forme lipidée LC3-II le statut de marqueur universel de l'autophagie (Lamb et al., 2013).
La courbure, l'élargissement et la fermeture du phagophore représentent des étapes structurales essentielles du processus autophagique. Parmi les protéines impliquées, ATG9A occupe une place centrale. Il s'agit de la seule protéine ATG transmembranaire connue à ce jour. En coopération avec ATG2, ATG9A participe à l'apport lipidique nécessaire à l'expansion du phagophore (*Figure 24*).

L'une des activités clés d'ATG9A réside dans sa fonction de brouilleuse lipidique, qui permet le transfert de phospholipides entre les deux feuillets de la bicouche lipidique du phagophore. Cette activité est finement coordonnée avec celle d'ATG2A, responsable du transport des lipides depuis les membranes donneuses vers ATG9A, facilitant ainsi leur insertion dans la membrane en croissance (Vliet et al., 2022).
Par ailleurs, des données récentes suggèrent qu'ATG9A peut également exercer des fonctions indépendantes d'ATG2A, notamment en participant au trafic et à la synthèse des lipides *via* l'interaction avec le complexe VPS13A (van Vliet et al., 2024). Les fonctions spécifiques d'ATG9A seront développées plus en détail ultérieurement dans le manuscrit.

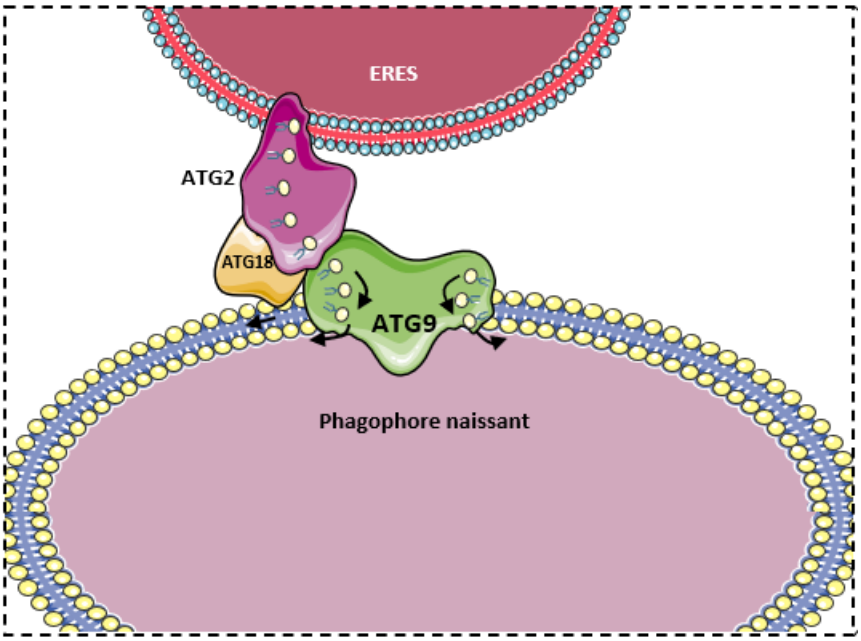



***Figure 24 : Expansion du phagophore dépendant d'ATG9A***

*Au cours de l'initiation de l'autophagie, l'expansion du phagophore dépend d'un apport coordonné de lipides membranaires. L'enzyme de transfert lipidique ATG2 joue un rôle clé dans ce processus en assurant le transport des lipides depuis les sites de sortie du réticulum endoplasmique (ER exit sites, ERES) vers la membrane du phagophore naissant. Ce transfert est facilité par la protéine d'échafaudage ATG18. La protéine transmembranaire ATG9A via l'apport en lipide par ATG2, permet la redistribution des phospholipides du feuillet cytoplasmique vers le feuillet luminal de la membrane d'isolation. Cette redistribution est essentielle pour assurer une croissance symétrique de la bicouche lipidique et permettre l'expansion homogène du phagophore.*
*En l'absence d'ATG9A, les vésicules restent asymétriques, les lipides s'accumulant uniquement dans le feuillet cytoplasmique, ce qui empêche l'élargissement du phagophore et bloque la formation complète de l'autophagosome d'après Vliet et al., 2022).*

**Contribution de l'appareil de Golgi et du compartiment ERGIC**

La biogenèse et l'expansion de l'autophagosome nécessitent un apport membranaire provenant de différentes sources intracellulaires, notamment le Golgi, la membrane plasmique, les endosomes et du compartiment intermédiaire réticulum endoplasmique–Golgi (ERGIC) (Lamb et al., 2013). Ces membranes ne servent pas uniquement de matériaux structurels, elles permettent également l'intégration sélective de lipides et de protéines conférant à l'autophagosome son identité fonctionnelle finale.

Trois voies moléculaires majeures participent à cette expansion membranaire (Chang & Yang, 2022) :

- La voie dépendante de la protéine transmembranaire ATG9A,
- Le trafic régulé par les protéines RAB,
- Le complexe PI3KC3

Un point commun à ces voies est leur localisation au niveau de l'appareil de Golgi, ce qui suggère que cet organite sert de plateforme de trafic vésiculaire vers le site de formation de l'autophagosome. De manière intrigante, la rétention de Beclin-1 au Golgi inhibe l'activité du complexe PI3K à son site de nucléation, soulignant l'importance du trafic dynamique entre le Golgi et les autres compartiments (Lamb et al., 2013).

De plus, le ERGIC a également son importance dans la nucléation et l'élongation du phagophore, par l'induction de la lipidation de LC3 en réponse à l'activation de l'autophagie (Ge et al., 2013). La perturbation de l'intégrité de l'ERGIC inhibe la formation de l'autophagosome (Ge et al., 2013).

**Rôles des protéines Rab situées au niveau de l'appareil de Golgi**

Les petites GTPases de la famille RAB jouent un rôle crucial dans le trafic membranaire durant l'autophagie. Deux RABs localisés au Golgi, RAB1 et RAB33B, ont été directement associés à la formation et à l'expansion de l'autophagosome.

- RAB1, connu pour sa fonction dans le trafic ER–Golgi, est indispensable à la formation de l'omégasome, précurseurs des phagophores. Sa déplétion ou la surexpression de formes dominantes négatives bloque la formation de l'autophagosome (Zoppino et al., 2010; J. Huang et al., 2011).
- RAB33B intervient à un stade plus avancé du processus autophagique. Il interagit avec ATG16L1 et favorise la lipidation de LC3. Sa forme active (liée au GTP) stimule l'autophagie, alors que son inactivation freine la fusion autophagosome–lysosome (Itoh et al., 2008, 2011). Ces données suggèrent que RAB33B est impliqué dans les étapes d'expansion mais aussi dans la maturation de l'autophagosome.

**Fermeture du phagophore**

Une étape importante et finalisant la formation de l'autophagosome est la fermeture de celui-ci. Lors de la formation du phagophore, la double membrane s'expand autour de la cible à dégrader et se replie pour ne laisser qu'un col membranaire non fermé. Celui-ci reste ouvert sur le cytosol, réprimant l'acidification de l'intérieur de la vésicule et la dégradation (Hurley, 2010).

La fermeture du col est réalisée par la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), connue pour son rôle dans la scission membranaire de structures

ouvertes sur le cytosol, comme les endosomes (Takahashi et al., 2018; F. Zhou et al., 2019; Vietri et al., 2020). Chez l'humain, c'est plus précisément le complexe ESCRT-I, ainsi que complexe ESCRT-III qui jouent un rôle important dans la fermeture du phagophore (Takahashi et al., 2019; Flower et al., 2020) (*Figure 25*).

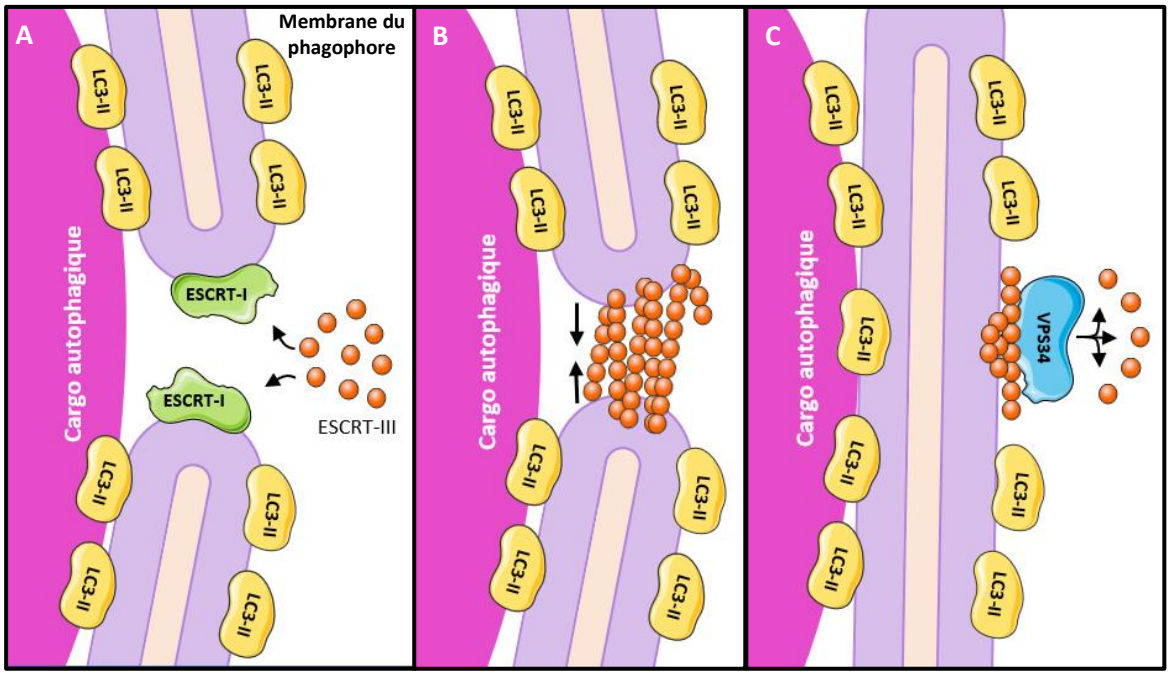



***Figure 25 : Rôle des protéines ESCRT dans la fermeture du phagophore***
*(A) Les protéines ESCRT-I sont d'abord recrutées au niveau du bord du phagophore, suivies par l'assemblage des protéines ESCRT-III. (B) Ces dernières forment un filament en spirale qui rapproche les membranes et permet leur fusion. (C) L'ATPase VPS34 facilite la fermeture finale en dépolymérisant le filament ESCRT-III. LC3-II semble également impliqué dans ce processus, bien que son rôle précis reste à élucider (adapté de Melia et al., 2020).*

### *3.4) Fusion de l'autophagosome avec un lysosome*

Une fois formé, l'autophagosome peut suivre deux voies de maturation : fusionner directement avec un lysosome pour former un autolysosome, ou d'abord s'unir à un endosome tardif pour constituer un amphisome, qui fusionnera ensuite avec un lysosome (L. Yu et al., 2010). Chez les mammifères, les autophagosomes générés à partir du RE, diffusent dans le cytosol, puis sont transportés vers les lysosomes le long des microtubules *via* le complexe moteur dyneine–dynactine. La fusion avec le lysosome repose sur plusieurs acteurs

clés (*Figure 26*) (Jäger et al., 2004; T. Wang et al., 2011; X. Li et al., 2016; Kuchitsu & Fukuda, 2018):

- RAB7, une petite GTPase impliquée dans le transport et l'ancrage des autophagosomes,
- STX17 (syntaxine 17), une protéine SNARE situé sur l'autophagosome qui forme un complexe avec SNAP29 (Synaptosomal-associated Protein 29) et VAMP8 (Vesicle-associated Membrane Protein 8),
- Le complexe HOPS (Homotypic Fusion and Vacuole Protein Sorting), un facteur d'ancrage membranaire qui facilite la fusion.

Différents cofacteurs (PLEKHM1, EPG5, ATG14L, TECPR1) participent à la régulation fine de cette fusion (McEwan et al., 2015; Lőrincz & Juhász, 2020).

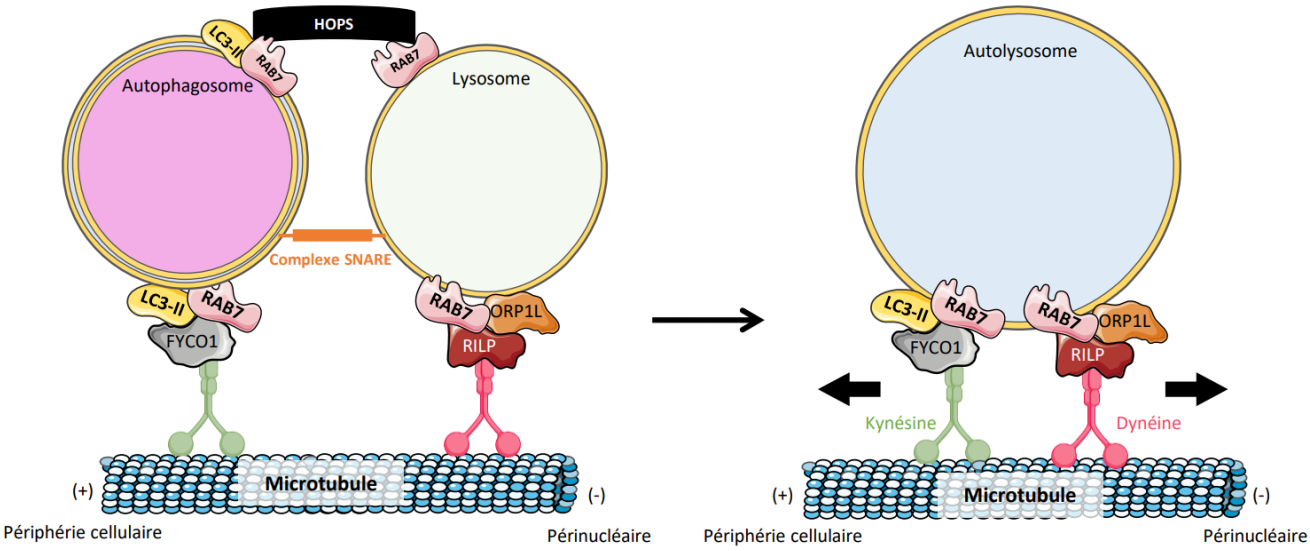



***Figure 26 : Trafic et fusion des autophagosomes et autolysosomes***

*HOPS facilite la fusion des autophagosomes avec les lysosomes ou endosomes tardifs. Recrutée via Rab7 et le complexe SNARE sur les membranes lysosomales, HOPS interagit également avec LC3-II et le complexe SNARE sur l'autophagosome. Elle stabilise ainsi l'assemblage du complexe trans-SNARE, essentiel à la fusion (Wang et al., 2016).*

*Le transport bidirectionnel des autophagosomes et autolysosomes le long des microtubules est orchestré par Rab7. En interaction avec FYCO1, Rab7 recrute la kinésine pour diriger le trafic vers l'extrémité plus (périphérie cellulaire). Inversement, Rab7 peut s'associer à ORP1L et RILP, ce dernier reliant le complexe dynéine, assurant le transport rétrograde vers la région périnucléaire (Kuchitsu & Fukuda, 2018).*

L'acidification du lysosome est cruciale pour l'activité enzymatique. Les protéines LAMP1 et LAMP2A, localisées sur la membrane lysosomale, assurent sa stabilité et sa protection contre l'auto-digestion (Eskelinen, 2006). La dégradation des cargos est effectuée par des enzymes

lysosomales, notamment les cathepsines, les hydrolases, libérant des constituants réutilisables dans le cytosol (L. Yu et al., 2010).

## 4) La protéine ATG9A et son implication dans les processus autophagiques

### *4.1) Caractéristique d'ATG9A*

ATG9A est une composante essentielle de la machinerie autophagique, agissant dès les premières étapes de la biogenèse des autophagosomes. Exprimée de manière ubiquitaire, elle se distingue de son homologue ATG9B, dont l'expression est limitée au placenta et à la glande pituitaire(Chiduza et al., 2024). Bien que présentant une forte homologie de séquence, ATG9A et ATG9B sont codées par des gènes distincts, localisés respectivement sur les bras longs (q) des chromosomes 2 (2q35) et 7 (7q36) (Robb et al., 2004). Bien que leurs fonctions soient similaires dans le processus autophagique, ATG9B semble jouer un rôle plus spécifique dans le développement des mammifères, en lien avec son expression tissulaire restreinte.

Parmi les protéines ATG, ATG9A est la seule à comporter plusieurs domaines transmembranaires, hautement conservés entre espèces. En revanche, ses régions extracellulaires, plus variables en longueur et en séquence, pourraient sous-tendre certaines divergences fonctionnelles entre les espèces (Young et al., 2006).

Des études de cryomicroscopie électronique ont révélé que la protéine ATG9A forme un homotrimère chez l'humain (Guardia et al., 2020; Maeda et al., 2020). Cette structure trimérique adopte une configuration triangulaire. Le trimère d'ATG9A présente trois types différents de pores (*Figure 27*) :

- Un pore central, orienté perpendiculairement à la membrane,
- Trois pores latéraux, parallèles à la membrane et connectés à l'environnement extérieur,
- Trois pores perpendiculaires, hypothétiquement connectés aux deux autres types de pores (Guardia et al., 2020 ; Maeda et al., 2020).

Cette architecture complexe de canaux forme un entonnoir facilitant le transfert de phospholipides entre les feuillets de la double membrane. Des changements conformationnels d'ATG9A ont été observés, modulant le diamètre du pore central. Ces

observations soutiennent l'hypothèse selon laquelle ATG9A agirait comme brouilleuse lipidique (Maeda et al., 2020; Vliet et al., 2022). Toutefois, une autre étude a suggéré que le pore central pourrait être trop étroit pour laisser passer des phospholipides, ne permettant que le passage de molécules de taille bien inférieure (Guardia et al., 2020).

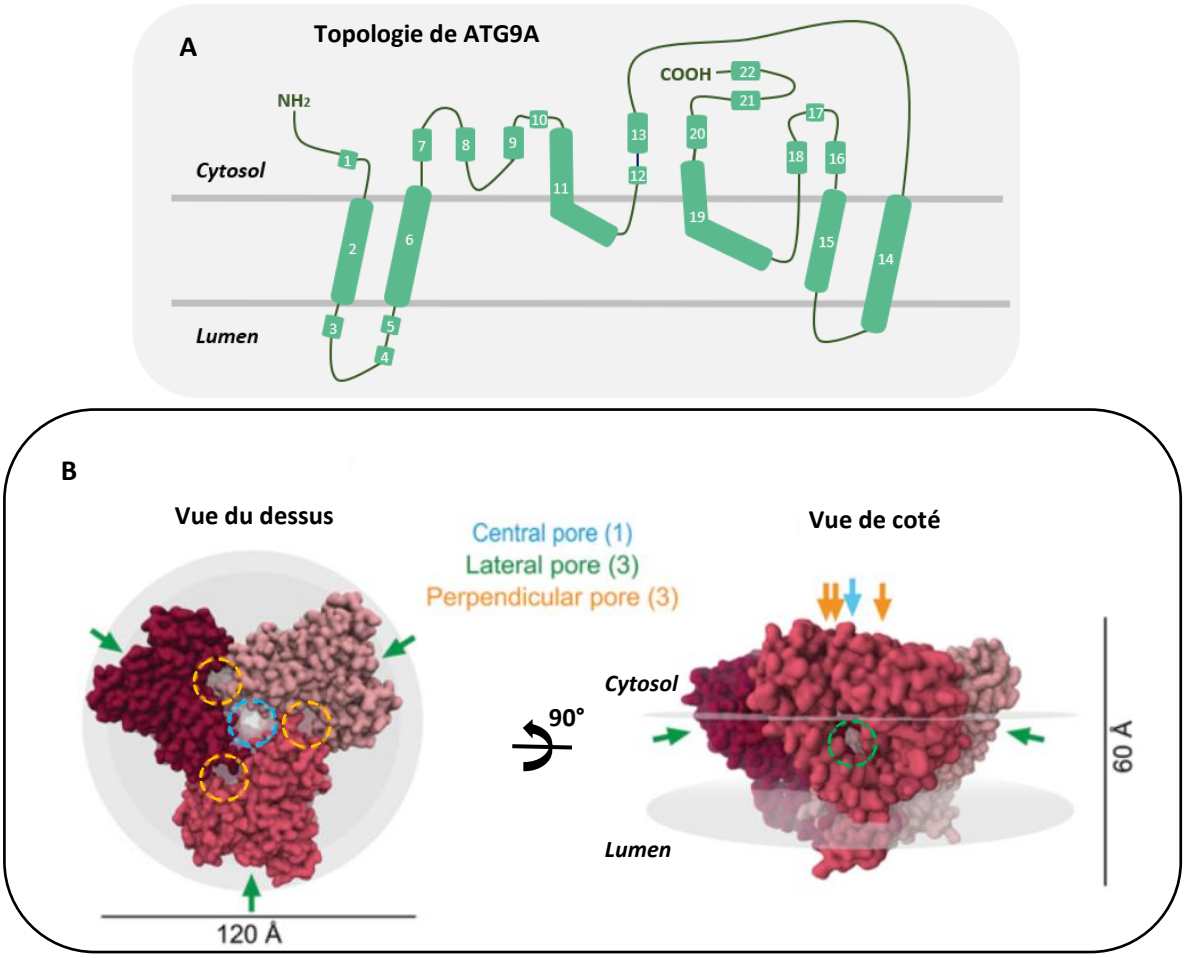



***Figure 27 : Structure ATG9A humain***

*(A) Représentation topologique d'un monomère d'ATG9A. (B) Structure trimérique d'ATG9A reconstituée par cryo-EM. Chaque monomère est coloré distinctement. Les disques gris indiquent les limites de la membrane. Le modèle couvre les résidus 36 à 587 (résidus 96–108 et 536–538 absents), et inclut deux hélices supplémentaires du domaine C-terminal. Le trimère présente trois types de pores, indiqués par des flèches. Le monomère complet comporte 839 acides aminés (adapté de Choi et 2024).*

Des simulations de dynamique moléculaire indiquent que les changements conformationnels d'ATG9A peuvent induire une courbure membranaire et favoriser sa localisation dans des zones très courbées (Guardia et al., 2020). Par ailleurs, une forme hexamérique d'Atg9 de

levure, observée *in vitro*, montre une association tête-à-tête entre deux trimères sur des membranes distinctes (Matoba et al., 2020). Bien que la présence *in vivo* de telles structures chez l'humain reste incertaine, cette interaction pourrait jouer un rôle crucial dans l'établissement de sites de contact entre les vésicules ATG9/ATG9A et d'autres organites, favorisant ainsi l'expansion du phagophore (Choi et al., 2024).

### 4.2) Rôle d'ATG9A dans la biogenèse du phagophore

L'appareil de Golgi a été le premier compartiment identifié comme jouant un rôle majeur dans la biogenèse des phagophores, en tant que source principale de phospholipides et de vésicules ATG9A (A. R. J. Young et al., 2006; Mari et al., 2010; van der Vaart et al., 2010; Marcassa et al., 2017). ATG9A circule sous forme de vésicules entre divers compartiments intracellulaires, incluant le réseau trans-Golgi (TGN), les endosomes tardifs et de recyclage, ainsi que la membrane plasmique. Elle permet l'acheminement ciblé de lipides et de protéines vers le site d'initiation du phagophore (Orsi et al., 2012; Imai et al., 2016; Noda, 2017; C. Zhou et al., 2017). En condition de privation en acides aminés, une fraction d'ATG9A est redistribuée vers l'omégasome, facilitant ainsi l'initiation du phagophore à partir du réticulum endoplasmique (Young et al., 2006 ; Mari et al., 2010).

Toutefois, chez les mammifères, ATG9A interagit de manière transitoire avec le phagophore sans s'intégrer durablement à sa membrane au cours de la formation des autophagosomes (Orsi et al., 2012). En effet, ATG9A est le seul facteur autophagique qui ne s'accumule pas significativement au site de formation de l'autophagosome, et seule une quantité limitée de cette protéine est requise à cette étape (Broadbent et al., 2023.; Olivas et al., 2023). Par ailleurs, une accumulation d'ATG9A dans les lysosomes a été observée, indiquant une possible intégration partielle dans la membrane des autophagosomes en cours d'expansion (Broadbent et al., 2023).

Les vésicules ATG9A issues du Golgi transportent notamment la phosphatidylinositol 4-kinase β (PI4KIIIβ) vers le site d'initiation de l'autophagosome, stimulant la production de phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) et le recrutement du complexe ULK, déclencheur clé de l'autophagie (Judith et al., 2019; Kakuta et al., 2017). Elles contiennent également la phosphatidylinositol 4-kinase IIα (PI4KIIα), qui pourrait contribuer à la génération de PI4P lors des étapes tardives de maturation de l'autophagosome (H. Wang et al., 2015).

ATG9A, par sa fonction de « brouilleuse lipidique » permet le transfert de phospholipides entre le feuillet cytosolique et le feuillet luminal de la membrane du phagophore, contribuant ainsi à son expansion membranaire (Van Vliet et al., 2022).

Broadbent et al. ont proposé un modèle distinguant deux populations de phagophores :

- Les pré-phagophores, mobiles, correspondant à des vésicules ATG9A en cours de recrutement des protéines autophagiques.
- Les phagophores matures, plus statiques, ancrés aux membranes donneuses *via* ATG2A.

Ce modèle suggère que l'enrichissement progressif en protéines autophagiques des vésicules ATG9A initie la formation du phagophore, tandis que leur ancrage aux membranes donneuses *via* ATG2A favorise sa maturation en autophagosome (D. G. Broadbent et al., 2023).
Récemment, les vésicules contenant ATG9A ont été identifiées comme des nanovésicules intracellulaires (INVs), une large classe de structures de transport. La protéine TPD54, présente dans certaines INVs, est essentielle à la formation des vésicules ATG9A lors d'un stress de jeûne et favorise l'autophagie. Ces INVs riches en ATG9A auraient une fonction lipidique, liée à l'activité de brouillage membranaire d'ATG9A, et pourraient jouer un rôle dans divers processus biologiques (Fesenko et al., 2025).

### *4.3) Régulation du trafic d'ATG9A*

Le trafic intracellulaire d'ATG9A est finement régulé par des complexes d'adaptines, notamment AP-1, AP-2 et AP-4 (Adaptor protein-1/2/4). Sa région N-terminale cytosolique contient des motifs de tri conservés (tyrosine et dileucine), indispensables à son export depuis le réseau trans-Golgi (*via* AP-1 et AP-4) et depuis les endosomes de la membrane plasmique (*via* AP-2) (Imai et al., 2016; C. Zhou et al., 2017; Mattera et al., 2017, 2020). Parmi eux, le motif YXXΦE (Φ correspond à un acide aminé hydrophobe) permet une interaction avec AP-4. La mutation ou la déplétion d'AP-4 bloque ATG9A au TGN, empêchant sa redistribution (Zhou et al., 2017 ; Mattera et al., 2017). Bien qu'AP-1 et AP-2 puissent également interagir avec ATG9A, leur affinité plus faible suggère un rôle prédominant d'AP-4 (Y. Guo et al., 2012; Popovic & Dikic, 2014). La surexpression de RUSC2, une protéine accessoire du complexe AP-4 localisée au niveau de l'appareil de Golgi, entraîne une accumulation périphérique de

vésicules AP-4 contenant ATG9A, soulignant son rôle dans leur positionnement subcellulaire (Davies et al., 2018; Guardia et al., 2021).

Par ailleurs, les petites GTPases Arf (ADP ribosylation factor) régulent également ce trafic. Arf1, recrutée au TGN *via* Arl1 (DP-ribosylation factor-like protein 1) et PI4P, participe à la formation de granules sécrétoires, tandis qu'Arf2 contrôle l'exocytose des métalloprotéinases et la sortie d'ATG9A du Golgi (De Tito et al., 2020). La déplétion d'Arf2 ou l'inhibition de sa liaison au PI4P perturbe la localisation périnucléaire d'ATG9A, diminue les structures ULK1-positives et freine la formation des autophagosomes LC3B-positif (Judith et al., 2019).

La sphingomyéline influence également le trafic d'ATG9A. Son accumulation perturbe la maturation des membranes autophagiques, entraînant l'accumulation de structures immatures enrichies en WIPI2, ATG16L1 et LC3B, mais appauvries en ATG9A. La restauration d'ATG9A corrige ce défaut, soulignant son rôle clé dans la maturation des membranes précoces (Corcelle-Termeau et al., 2016).

### *4.4) Autres rôles d'ATG9A*

Au-delà de son rôle dans la formation et l'expansion des phagophores, ATG9A serait également impliquée dans la fermeture des autophagosomes. Elle interagit avec des composants du complexe ESCRT-III, indispensable à la scission membranaire finale, suggérant une implication dans l'étape terminale de la formation de l'autophagosome (Javed et al., 2025).

ATG9A est impliquée dans d'autres processus biologiques que l'autophagie. D'une part, elle joue un rôle clé dans le métabolisme lipidique mitochondrial, en facilitant le transfert des acides gras des gouttelettes lipidiques vers les mitochondries, où ils alimentent la chaîne respiratoire (Mailler et al., 2021). D'autre part, ATG9A semble réguler le trafic des intégrines dans les cellules de glioblastome, induisant des capacités migratoires aux cellules tumorales (Campisi et al., 2022).

## 5) Régulation transcriptionnelle et épigénétique des gènes de l'autophagie

### 5.1) Facteurs de transcription

La régulation transcriptionnelle de l'autophagie repose sur un réseau complexe de facteurs de transcription qui orchestrent l'expression de gènes autophagiques en réponse à divers stimuli physiopathologiques (*Tableau 3*). Parmi ceux-ci, STAT3 et TFEB (Transcription Factor EB) occupent des positions centrales, en raison de leurs effets opposés sur le processus autophagique.

Le facteur de transcription STAT3 exerce un rôle inhibiteur de l'autophagie à divers niveaux. Sur le plan transcriptionnel, STAT3 réprime *BECN1 via* le recrutement de la déacétylase HDAC3 (Histone Deacetylase 3) (Miao et al., 2014) et active la transcription de *PIK3R1* (isoformes p55α/p50α), antagonisant l'effet pro-autophagique de l'isoforme p85α (Pensa et al., 2014). Il induit également les gènes anti-autophagiques *BCL2*, *BCL2L1* et *MCL1* (Tai et al., 2013). Sur le plan cytoplasmique, STAT3 inhibe l'activité de EIF2AK2, réduisant ainsi la phosphorylation d'EIF2A, un médiateur clé de la réponse autophagique (Niso-Santano et al., 2013).

De son côté, TFEB est un facteur transcriptionnel majeur de la biogenèse lysosomale et de l'autophagie, particulièrement activé en condition de stress nutritionnel (Sardiello et al., 2009; Settembre et al., 2011). Sa translocation nucléaire induit l'expression de gènes essentiels à l'autophagie, tels que *WIPI*, *VPS11*, *LAMP1*, *MAP1LC3B* et *UVRAG* (Sardiello et al., 2009; W. Zeng et al., 2017). L'activité de TFEB est régulée par des modulateurs en amont comme STUB1 et MAP4K3, ce dernier contrôlant sa phosphorylation et sa localisation nucléaire (Sha et al., 2017; C. L. Hsu et al., 2018). D'autres facteurs comme *PEG3*, *AKT* et *BRD4* influencent également l'activité transcriptionnelle de TFEB (F. Huang et al., 2018).

Un antagoniste transcriptionnel de TFEB est la protéine ZKSCAN3 (Zinc Finger with KRAB and SCAN Domains 3), un facteur de transcription de la famille des protéines à doigts de zinc. Elle est en capacité de réprimer l'expression de nombreux gènes autophagiques et lysosomaux tels que LC3 ou WIPI2 (Chauhan et al., 2013). ZKSCAN3 apparaît ainsi comme un régulateur négatif clé du programme autophagique.

D'autres facteurs agissent comme activateur transcriptionnel de l'autophagie, notamment FOXO1, un régulateur dans la réponse au stress métabolique, HIF1, activé en condition

hypoxique, ATF4, induit lors du stress du réticulum endoplasmique. En revanche, la β-caténine et STAT1 ont un rôle de répresseurs transcriptionnels de ces mêmes gènes (Füllgrabe et al., 2014). Ces données soulignent la dualité des mécanismes de régulation de l'autophagie selon le contexte cellulaire.

***Tableau 3 : Les différents facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'autophagie***

| Facteur de transcription | Effet sur l'autophagie | Cibles principales | Particularités | Références |
|---|---|---|---|---|
| TFEB | + | ATG9, MAP1LC3B, GABARAPL1, WIPI1, ATG16L1 | Maître régulateur. Activé par déphosphorylation | *Settembre et al, 2011; Roczniak-Ferguson et al 2012, Martina et al, 2015* |
| ZKSCAN3 | - | ULK1, WIPI2, STX5, ATP6V1A | Répresseur opposé à TFEB, relocalisé au cytosol en cas de stress | *Chauhan et al, 2013* |
| FOXO1/FOXO3 | + | ATG12, ATG5, ULK1, PIK3C3, BECN1 | Aussi activité indépendante *via* interaction cytosolique avec ATG7 | *Zhao et al, 2007 Mammucari et al, 2007, Sengupta et al, 2009; Zhao et al, 2010; Zhou et al, 2012; Greer et al, 2007* |
| TP53 | +/- | ATG7, BECN1, DRAM1, ULK1/2 | Active ou inhibe selon sa localisation (noyau vs cytosol) | *Gao et al, 2011; Kenzelmann et al, 2013; Crighton et al, 2006; Tripathi et al, 2014; Goiran et al 2018* |
| E2F1/E2F3 | + | BECN1, MAP1LC3B, DRAM1 | Active ATG gènes et BNIP3 ; peut aussi inhiber la mitophagie (*via* MFN2) | *Polager et al, 2008; Bucha et al, 2019* |
| NFKB | +/- | BECN1, BNIP3 | Réprime BNIP3 en normoxie mais l'induit en hypoxie | *Tracy et al, 2007; Shaw et al, 2008* |
| GATA1 | + | ATG4B, GABARAPL1/2, MAP1LC3B | Active autophagie | *Kang et al, 2012* |
| GATA4 | - | BECN1, ATG5, ATG7, ATG12 | Inhibiteur par activation de BCL2 | *Kobayashi et al, 2010, 2006* |
| CREB | + | ATG5, ATG7, ULK1 | Activé par la famine, inhibé par FXR | *Soek et al, 2014* |
| ATF4 / DDIT3 (CHOP) | + | BECN1, ATG5, ATG10, GABARAPL2 | Activés par le stress cellulaire (UPR, stress oxydatif) | *Pike et al, 2013; B'Chir et al, 2013* |
| STAT1 / STAT3 | - | BECN1, PIK3R1, ULK1 | STAT3 peut inhiber FOXO *via* liaison cytosolique | *You et al, 2015; Oh et al, 2012, Shen et al, 2012* |
| KLF2 / KLF4 / ZNF148 | + | ULK1, PIK3C3, ATG9 | Induisent autophagie *via* régulation transcriptionnelle | *Salmon et al, 2019* |
| MITF / TFE3 | + | MAP1LC3B, GABARAPL1, ATG4A | Membres de la famille MiT/TFE comme TFEB | *Martina et al, 2015; Moller et al, 2019* |
| SOX2 | + | BECN1 | Moins bien caractérisé | *Zhu et al, 2021* |
| SMAD2 | - | BECN1 | Inhibiteur transcriptionnel | *Pan et al, 2015* |
| c-JUN | + | BECN1, MAP1LC3B | Lié à la réponse au stress | *Li et al, 2009; Sun et al, 2011* |

### 5.2) Régulation épigénétique

Les mécanismes épigénétiques régulent l'expression des gènes par le biais de modifications post-traductionnelles des histones, activant ou réprimant la transcription.

Dans le cadre de l'autophagie, la régulation épigénétique jouent un rôle clé en modulant l'accessibilité de la chromatine. Ce contrôle est particulièrement important en contexte pathologique, comme le cancer, où les altérations épigénétiques affectent l'expression des gènes autophagiques. Les Histones modifiées et la méthylation de l'ADN sont ainsi au cœur de la régulation transcriptionnelle de ce processus.

Certaines marques épigénétiques sont associées à une répression de l'autophagie. C'est notamment le cas de la diméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me2)**,** médiée par la méthyltransférase G9a**,** qui est retirée des promoteurs des gènes cibles lors de l'activation du processus autophagique, favorisant ainsi l'expression de LC3B et SQSTM1/p62 (Sequestosome 1) (Artal-Martinez de Narvajas et al., 2013). De même, la triméthylation de H3K27 (H3K27me3), catalysée par EZH2, réprime l'autophagie par l'activation de la voie mTOR (F.-Z. Wei et al., 2016).

À l'inverse, d'autres marques épigénétiques sont associées à une activation de l'autophagie. La diméthylation de l'arginine 17 de H3 (H3R17me2), induite par la méthyltransférase CARM1 (Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1), est augmentée en condition de privation nutritionnelle. Ce mécanisme est régulé par l'axe AMPK–FOXO3a, qui réprime l'expression de SKP2, stabilisant ainsi CARM1 et augmentant les niveaux de H3R17me2 (H.-J. R. Shin et al., 2016).

Parmi les marques activatrices, la désacétylation de H4K16, contrôlée par la lysine désacétylase Sirtuin 1 (SIRT1), participe à l'induction de l'autophagie dans les cellules cancéreuses humaines en modulant l'expression de plusieurs gènes autophagiques (Füllgrabe et al., 2013). D'autres modifications telles que la monoubiquitination de H2BK120, l'acétylation de H3K56 et la méthylation de H4K20 ont également été impliquées dans la régulation fine de l'autophagie .

## C. Autophagie et cancer

L'autophagie joue de multiple rôle dépendant du stade et du contexte au cours de la progression tumorale. Elle est activée en conditions de stress : pression inertielle élevée, augmentation de la population de cellules cancéreuse, accumulation de déchets, l'hypoxie ou encore la radiothérapie et la chimiothérapie. De ce fait, l'autophagie est associée à plusieurs caractéristiques clés du cancer (*Figure 28*).

### 1) Suppresseur de tumeur

L'autophagie constitue un mécanisme de protection cellulaire en éliminant les composants cellulaires endommagés, en maintenant la stabilité génomique, et en limitant l'inflammation, les infections virales ainsi que les perturbations de l'homéostasie (Mathew et al., 2009). Dans les cellules saines, l'autophagie exerce un rôle cytoprotecteur en limitant le stress cellulaire, l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles, de ROS, dont l'excès peut entraîner une instabilité génomique et protéique propice à la transformation maligne (Mukhopadhyay et al., 2022). En éliminant ces composants altérés, l'autophagie réduit le stress oxydatif tout en favorisant l'homéostasie cellulaire. Dans ce contexte, elle a un rôle préventif contre l'initiation de la carcinogenèse (Tian et al., 2015).

L'identification du gène *Becn1 (*Beclin-1*)*, dont la perte fréquente dans les cancers du sein et de l'ovaire, a constitué les premières preuves génétiques liant l'autophagie à la suppression tumorale (X. H. Liang et al., 1999). Les souris hétérozygotes pour *Becn1* présentent une autophagie réduite et sont prédisposées à divers types de tumeurs, établissant *Becn1* comme un gène suppresseur de tumeur haplo-insuffisant (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003). De façon similaire, la délétion de *Atg5* ou *Atg7* dans le foie de souris induit le développement d'adénomes hépatiques (tumeurs bénignes)(Inami et al., 2011; Takamura et al., 2011). De plus, dans les cellules tumorales bronchiques, STAT3 inhibe l'expression de Beclin-1, favorisant le développement tumoral (Miao et al., 2014).

L'inhibition de l'autophagie a également des effets délétères sur le microenvironnement tumoral. Son inhibition induit l'inflammation et la nécrose, créant un environnement favorable à la croissance tumorale (Degenhardt et al., 2006; Karantza-Wadsworth et al., 2007; Mathew et al., 2007). Par ailleurs, la perte de l'autophagie conduit à une accumulation de p62,

qui contribue à la tumorigenèse *via* l'activation de NF-κB, l'augmentation du stress oxydatif et l'instabilité génomique (Bjørkøy et al., 2006; Mathew et al., 2009). L'interaction de p62 avec Keap1 entraîne une activation aberrante de NRF2, impliqué dans la prolifération cellulaire dans certains cancers (Komatsu et al., 2010; Lau et al., 2010; Inami et al., 2011).

L'autophagie participe également à l'induction de la sénescence oncogénique, un mécanisme barrière contre la transformation maligne (A. R. J. Young et al., 2009). Dans le glioblastome, l'autophagie diminue les capacités migratoires et la TEM des cellules tumorales par une régulation négative de Snail et Slug (Catalano et al., 2015). L'autophagie médié par le TGF-β induit l'inhibition de la croissance dans les cellules de carcinome hépatocellulaire (Kiyono et al., 2009).

Les altérations de divers éléments de la voie PI3K/AKT joue un rôle dans la dérégulation de l'autophagie et la tumorigenèse. PTEN est un inducteur de l'autophagie dans les cellules tumorales du colon et inhibe la voie de survie Akt facilitant les processus autophagiques. Alors que les mutations inactivatrices de PTEN ou l'activation permanente de Akt conduit à une répression de l'autophagie (Errafiy et al., 2013).

### 2) Oncogène

Dans le contexte tumoral, l'autophagie peut acquérir un rôle pro-tumorigène, en particulier lorsque les cellules sont soumises à des conditions de stress. Elle permet alors de maintenir un niveau minimal d'énergie nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules cancéreuses. De plus, elle contribue à la protection des cellules tumorales contre les réponses immunitaires ou l'anoïkis lors de la dissémination métastatique (Harding et al., 2000; Rouschop et al., 2010; N. Chen & and Debnath, 2013). Un flux autophagique important dans les tumeurs avancées favorise le caractère invasif et métastatique ainsi que le mauvais pronostic des patients (Mowers et al., 2017). Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre l'augmentation de l'expression de LC3B et la présence de métastases, notamment dans le cancer du sein (Lazova et al., 2012; S. Chen et al., 2013), le mélanome (X.-H. Ma et al., 2011), le carcinome hépatocellulaire (Peng et al., 2013; Peng, Shi, et al., 2013) et le glioblastome (Q. Chen et al., 2017).

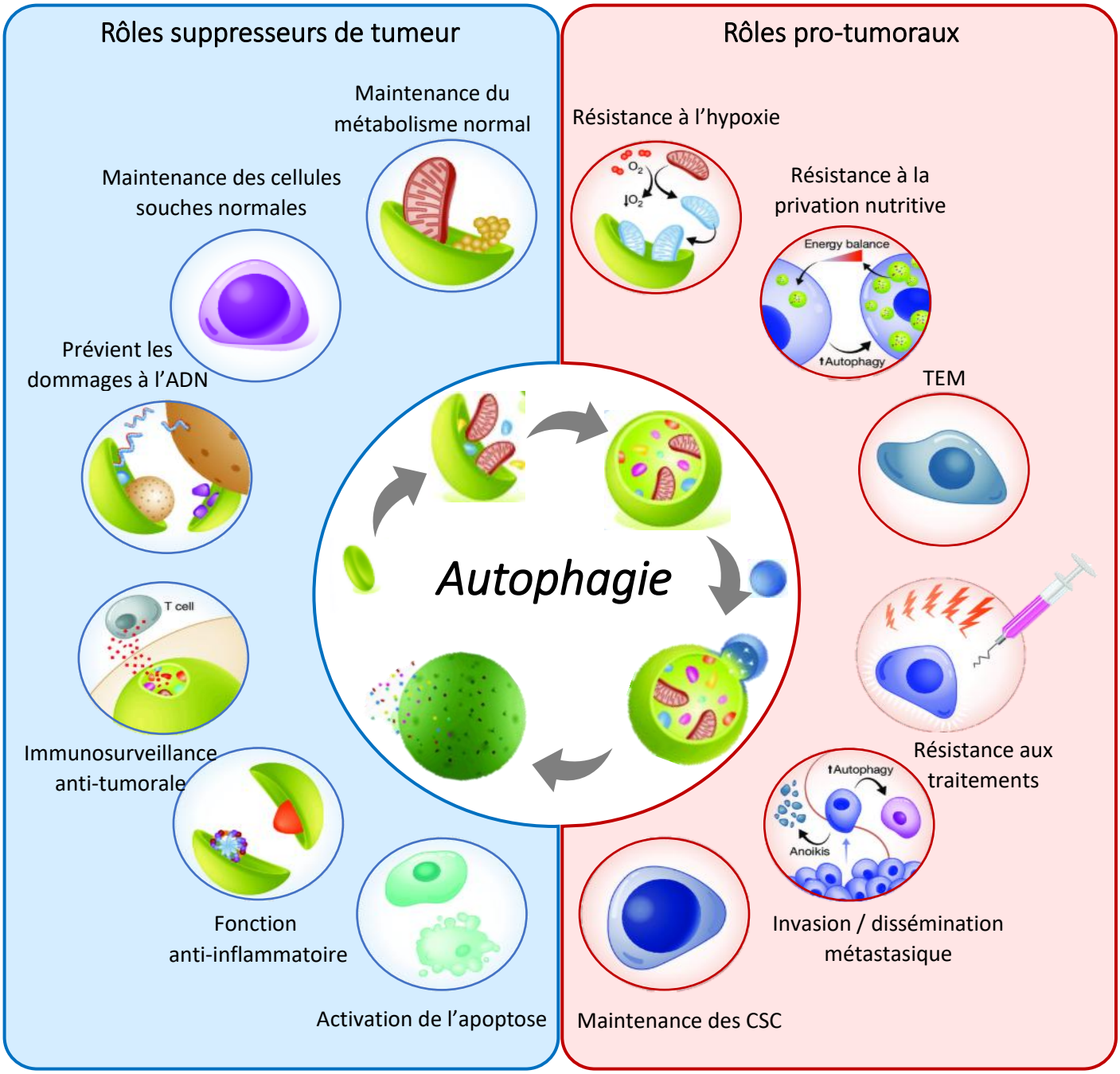



***Figure 28 : Fonctions de l'autophagie dans le développement tumoral***

*L'autophagie supprime la transformation maligne par différents mécanismes, avec le maintien du métabolisme via l'élimination des espèces réactives à l'oxygène, le maintien des fonction bioénergétiques normales, la dégradation des agrégats, le maintien d'un pool de cellules souches normales, prévient des dommages à l'ADN par la préservation de la stabilité génétique/génomique, ainsi que par la dégradation des oncogènes, possède un rôle dans le déclenchement de l'immunosurveillance anti-tumorale, a des fonctions anti-onflammatoires, favorise la mort par apoptose.*

*L'autophagie favorise également la progression tumorale et la résistance aux traitements, favorise la survie des cellules cancéreuses aux conditions de stress telles que l'hypoxie la dénutrition ou le détachement de la matrice extracellulaire, facilite la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), l'invasion et la dissémination métastasique, rend les cellules tumorales moins sensible à la mort induite par les traitements, assure le maintien des cellules souches cancéreuses (CSC), (adapté de Galluzzi et al, 2015).*

### 2.1) Autophagie et survie

L'autophagie joue un rôle clé dans la résistance à l'anoïkis, en particulier dans les cellules épithéliales tumorales, favorisant la survie des CTC et par conséquent la formation de métastases (*Figure 29*).

En réponse au détachement de la MEC, l'autophagie est un mécanisme de survie temporaire qui retarde l'apoptose (Fung et al., 2008). La capacité des cellules tumorale à utiliser l'autophagie en réponse au détachement est corrélée à leur dérégulation métabolique. En effet, l'autophagie conditionne les cellules tumorales à la dormance, leur permettant de survivre dans des milieux hostiles, tout en permettant une reprogrammation *de novo* lors d'une amélioration environnementale (Boya et al., 2005). L'autophagie est régulée par divers stress dans les cellules détachées comme la privation de nutriments, l'hypoxie ou le stress oxydatif.

Elle est notamment induite par le capteur de stress EIF2AK3/PERK (Protein Kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase) qui engendre l'expression de gènes autophagiques (*ATG5*, *BECN1*, *LC3*) (Harding et al., 2000; Rouschop et al., 2010). EIF2AK3 agit également *via* l'activation d'AMPK et l'inhibition de la voie mTORC1, favorisant l'autophagie dans les cellules détachées (Avivar-Valderas et al., 2011). Toutefois, certains travaux indiquent une induction de l'autophagie indépendante de mTORC1–AMPK. En effet, dans les cellules épithéliales mammaires, une activation persistante de l'autophagie est observée malgré l'activité de mTORC1 (Chen & Debnath, 2012).

De plus, le complexe IKK constitue une autre voie de régulation : son activation induit l'autophagie et la résistance à l'anoïkis tandis que son inhibition bloque ces processus. L'activation d'IKK peut être déclenchée par l'inhibition des intégrines β1 et α3 (Chen & Debnath, 2012).

L'autophagie confère un avantage de survie en modulant les protéines pro-apoptotiques de la famille BCL2. En conditions de détachement, les protéines BMF (Bcl-2-modifying factor) et BIM, normalement inhibitrices de l'autophagie *via* leur interaction avec Beclin-1, se dissocient de Beclin-1 et permettent l'activation du processus autophagique, bloquant ainsi l'anoïkis (Puthalakath et al., 2001; S. Luo et al., 2012; Contreras et al., 2013). Cependant, les preuves *in vivo* restent limitées. L'inhibition de l'autophagie (par invalidation de *BECN1* ou *ATG5*) réduit

faiblement les métastases dans un modèle murin de carcinome hépatocellulaire, sans affecter les capacités de migration ou d'invasion (Peng, Shi, et al., 2013). À l'inverse, une augmentation de LC3 observée dans les métastases, sans activation apparente de l'autophagie au moment du détachement ou de la migration, suggère une implication différée de l'autophagie dans la colonisation métastatique (Peng, Shi, et al., 2013).

### *2.2) Hypoxie*

L'autophagie joue également un rôle central dans l'adaptation des cellules tumorales à l'hypoxie. Cette dernière induit l'expression du facteur HIF-1α, qui stimule une autophagie cytoprotectrice par l'activation des protéines Beclin-1 et BNIP3 (BCL2 Interacting Protein 3) (Bellot et al., 2009). HIF-1α peut également favoriser l'autophagie par l'intermédiaire de l'activation d'AMPK (Hu et al., 2012). D'autres mécanismes moléculaires ont été mis en évidence, notamment l'activation de la signalisation HMG1 (High Mobility Group Protein 1) *via* YAP-1 dans les cellules tumorales (M. Zhao et al., 2021) ou encore la surexpression de l'oncogène *SATB2*, qui induit une autophagie dépendante de l'hypoxie et favorise la survie des cellules souches cancéreuses (W. Dong et al., 2020). Ces processus visent à recycler les composants cellulaires endommagés dus à la privation d'oxygène, à maintenir la production énergétique, et *in fine* à assurer la survie des cellules tumorales dans un microenvironnement hostile.

### 2.3) *Reprogrammation métabolique et espèces réactive à l'oxygène*

Les cellules cancéreuses en prolifération rapide présentent des besoins métaboliques accrus, répondant à ces exigences par des réarrangements métaboliques. L'autophagie, en tant que mécanisme catabolique, est un acteur majeur permettant le recyclage des constituants cellulaires pour générer des métabolites nécessaires à la biosynthèse et à la production d'énergie. Ce processus atténue également le stress métabolique, en réduisant les effets délétères des ROS produites par l'augmentation de la phosphorylation oxydative *via* les intermédiaires du cycle de Krebs. L'élimination des ROS par l'autophagie contribue ainsi à la résilience métabolique des cellules tumorales (S. Yang et al., 2011; Kimmelman & White, 2017).

L'inhibition de l'autophagie dans divers modèles cellulaires et murin a entraîné une réduction de la glycolyse, un dysfonctionnement mitochondrial et une diminution de la production d'ATP (J. Y. Guo et al., 2011; Lock et al., 2011; H. Wei et al., 2011).

Dans les modèles murins de cancer du poumon et du pancréas induits par *KRASG12C* ou *BRAF*, la suppression de gènes clés de l'autophagie (*Atg5, Atg7*) a diminué la progression tumorale, induit une accumulation de mitochondries anormales, altéré le métabolisme lipidique, et accru la dépendance à la glutamine pour pallier les défauts métaboliques (J. Y. Guo et al., 2013; Strohecker et al., 2013a; Rao et al., 2014).

L'autophagie joue un rôle critique dans le soutient des besoins bioénergétiques et la gestion du stress oxydatif, favorisant la croissance tumorale.

### 2.4) Microenvironnement tumoral et échappement immunitaire

Dans les CAF et les cellules endothéliales, l'autophagie favorise l'apport en nutriments et en facteurs de croissance pour les cellules tumorales (Pavlides et al., 2009; A. Yang et al., 2018).

Elle contribue également à l'échappement immunitaire. Par exemple, dans les tumeurs pancréatiques, l'inhibition d'ATG7 ou d'ATG4 dans les cellules cancéreuses favorise l'infiltration des lymphocytes T CD8+ (Yamamoto et al., 2020). D'autres études montrent qu'un défaut d'autophagie augmente l'expression du CMH-I et favorise l'infiltration des cellules NK *via* la sécrétion de la cytokine CCL5 (Mgrditchian et al., 2017) (*Figure 29*).

### 2.5) Migration/invasion et dissémination métastatique

La migration cellulaire repose sur un équilibre dynamique entre formation et désassemblage des adhésions focales (AF), structures essentielles à l'ancrage et à la motilité cellulaire. Ce renouvellement est en partie régulé par l'autophagie, notamment par son implication dans la dégradation ciblée de composants des AF.

Plusieurs études ont mis en évidence une interaction fonctionnelle entre l'autophagie et la signalisation intégrine-dépendante. La kinase SRC, acteur clé de la transduction des signaux d'adhésion, co-localise avec des protéines autophagiques (ATG7, ATG12, LC3) dans les AF et les vésicules cytoplasmiques, suggérant un ciblage par l'autophagie (Sandilands et al., 2012). LC3 interagit directement avec SRC, mais si cette dégradation n'altère pas significativement la migration, elle semble favoriser la survie cellulaire en condition de perte d'adhérence,

permettant aux cellules d'échapper à l'anoïkis (Sandilands, Serrels, McEwan, et al., 2012; Sandilands et al., 2012).

L'autophagie est également cruciale pour le désassemblage des AF. Elle régule notamment l'interaction de la paxilline avec LC3B, dépendante de SRC. Une déficience autophagique entraine une accumulation d'adhésions focales et une réduction de la migration et des métastases (Lock et al., 2014; Sharifi et al., 2016).

Par ailleurs, l'autophagie régule la signalisation intégrine-PTK2 (Protein Tyrosine Kinase) *via* l'axe ULK1–FIP200. FIP200, un composant essentiel du complexe d'initiation de l'autophagie ULK1, interagit directement avec le domaine kinase de PTK2 et inhibe son activité, réduisant la migration cellulaire et la progression tumorale (Abbi et al., 2002; Hara et al., 2008; Caino et al., 2013). L'activation d'ULK1 ou/et de la kinase AMPK renforce l'interaction entre FIP200 et PTK2, inhibant la signalisation pro-migratoire dépendante de PTK2 ainsi que la formation de métastases dans des modèles murins (Caino et al., 2013). En revanche, l'inhibition de FIP200 altère la biogenèse des autophagosomes, diminuant la croissance tumorale primaire ainsi que celle des métastases pulmonaires dans certains modèles de cancer du sein, suggérant que FIP200 joue également un rôle essentiel dans l'initiation tumorale. Ces données illustrent la dualité contextuelle de cette protéine, ainsi que de l'autophagie dans ces processus.

Le trafic et la dégradation des intégrines sont essentiels pour le renouvellement des AF et à la promotion de la migration cellulaire (Paul et al., 2015). L'autophagie pourrait également réguler le trafic des intégrines. Les voies de l'autophagie et du trafic intégrine convergent au niveau des endosomes de recyclage RAB11-positifs, où les protéines autophagiques ULK1 et ATG9A contrôlent l'acheminement membranaire vers les phagophores (Longatti et al., 2012). De plus, Rab 11 favorise la formation des autophagosomes. TBC1D14 (TBC1 Domain Family Member 14), une RabGAP, présente sur les endosomes Rab11 positif, régule négativement le trafic d'ULK1, et sa dissociation sous conditions de jeûne favorise l'activation d'ULK1 et l'induction de l'autophagie (Longatti et al., 2012). Le récepteur de la transferrine présent dans ces endosomes est dirigé vers les phagophores, un mécanisme similaire pourrait également s'appliquer aux intégrines présentes dans les endosomes Rab11 positif.

De plus, les composants du complexe PI3KC3, PtdIns3K et RUBICON (Rubicon Autophagy Regulator), présents sur les endosomes précoces, pourraient participer à la régulation du recyclage des intégrines (Q. Sun et al., 2010). Enfin, l'accumulation de l'intégrine β1 et du récepteur MET dans des compartiments liés à l'autophagie positifs à LC3 dans des fibroblastes

est associée à une progression tumorale et une invasion dépendante d'ATG5 et Benclin-1, suggérant l'implication de l'autophagie dans la régulation du trafic des intégrines et des métastases (Barrow-McGee et al., 2016).

La famille des petites GTPases Rho, comprenant RhoA, Rac1 et CDC42, joue un rôle central dans la régulation de la motilité cellulaire *via* le contrôle des protrusions membranaires et du remodelage du cytosquelette (S. Chen et al., 2017; Füllgrabe et al., 2014; K. Martin et al., 2016). Différentes études ont démontré un lien étroit entre l'autophagie et ces GTPase dans la migration cellulaire. Des études démontrent que p62/SQSTM1 cible spécifiquement la forme active de RhoA pour sa dégradation via le système autophagique. Une inhibition de ce processus, par blocage de l'autophagie (ATG5, ATG7, p62), entraîne des défauts de cytokinèse, une multinucléation et une aneuploïdie, en raison de l'accumulation pathologique de RhoA activé (Belaid et al., 2013).

La signalisation Rho peut également moduler l'autophagie. ROCK1 (Rho-associated Protein Kinase 1), protéine en aval de RhoA, agit comme un régulateur de l'autophagie lors d'une famine, mais pas en condition basale (Aguilera et al., 2012; Mleczak et al., 2013). L'inhibition de ROCK1 induit une accumulation d'autophagosomes précoces enrichis en ULK1, suggérant que ROCK1 contrôle la dynamique d'élongation des phagophores (Mleczak et al., 2013). Par ailleurs, ROCK1 active l'autophagie en phosphorylant Beclin-1 (Thr119), perturbant son interaction avec Bcl-2, ce qui libère Beclin1 pour initier l'autophagie (Gurkar et al., 2013).

La coordination entre l'autophagie et la migration cellulaire implique une interaction fonctionnelle entre Rab7, essentiel à la maturation des autophagosomes, et Rac1, régulateur de la motilité cellulaire (K. Martin et al., 2016; Kuchitsu & Fukuda, 2018). La protéine Armus, par son interaction avec LC3, facilite la localisation de Rab7 au niveau des autophagosomes en réponse à la privation en acides aminés (Carroll et al., 2013). En parallèle, Rac1 doit être inactivé pour permettre ce processus. Rac1 actif entre en compétition avec LC3 pour se lier à Armus, perturbant ainsi la maturation autophagique (Carroll et al., 2013). Ces données montrent la régulation croisée et dynamique entre l'autophagie et la migration cellulaire.

Des études ont mis en lumière le rôle multifacette de l'autophagie dans les processus d'invasion et de migration tumorale. L'inactivation d'ATG12, dans un modèle de gliome, diminue la capacité des cellules à envahir une matrice de collagène (Macintosh et al., 2012). De même, dans les cellules souches de glioblastome, l'inhibition de l'autophagie ou la

déplétion de p62 a entraîné une diminution marquée de l'invasion et de la migration, en lien avec des altérations du métabolisme glycolytique nécessaire à ces fonctions (Galavotti et al., 2013).

Par ailleurs, dans les cellules de carcinome hépatocellulaire exposées à un stress de privation nutritive, l'autophagie active la voie TGF-β et induit la TEM renforçant ainsi le potentiel invasif (J. Li et al., 2013). Un effet similaire a été observé dans des cultures tridimensionnelles de cellules épithéliales transformées par Ras, où l'inhibition de l'autophagie limite la TEM, réduit la sécrétion de cytokines pro-invasives telles que IL-6, et restreint l'invasion cellulaire ; la réintroduction d'IL-6 restaure partiellement cette fonction, suggérant un lien fonctionnel entre autophagie et sécrétion (Lock et al., 2014). Ces résultats sont corroborés par des données *in vivo* montrant que les cellules transformées par Ras déficientes en autophagie présentent une diminution notable des métastases pulmonaires, ce qui souligne l'implication de la sécrétion dépendante de l'autophagie dans la dissémination tumorale (Z. Zhan et al., 2014).

De plus, l'autophagie régule également le niveau intracellulaire ou l'activation des facteurs de transcriptions de la TEM.

### *2.6) Sécrétion*

Les protéines sécrétées soutiennent de multiples aspects du cancer, notamment la prolifération cellulaire, l'évasion de l'apoptose et l'angiogenèse (Patel et al., 2014).

L'autophagie joue un rôle clé dans la régulation de la sécrétion protéique dans les cellules cancéreuses. Young et al. ont montré que dans la sénescence induite par un oncogène Ras, l'autophagie facilite la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 de manière post-traductionnelle (A. R. J. Young et al., 2009). Une autre étude a identifié un compartiment appelé TASCC (TOR-autophagy spatial coupling compartment), où mTOR, les vacuoles autophagiques et le RE co-localisent, favorisant une sécrétion massive de ces cytokines (Narita et al., 2011).

Dans un modèle de cancer du sein invasif induit par RAS, l'autophagie est indispensable à l'invasivité, la TEM et la sécrétion de facteurs pro-invasifs tels qu'IL-6, MMP-2/9 et WNT5A (Lock et al., 2014). L'autophagie médiée par Atg7 est également nécessaire à la sécrétion de

cytokines inflammatoires (CSF3, CXCL1, CCL2) après irradiation aux ultraviolets (L. Qiang et al., 2017).

Dans les cellules de mélanome, l'autophagie module le sécrétome tumoral. Les cellules ayant une forte activité autophagique sécrètent plus de cytokines pro-tumorigènes (IL-1β, CXCL8, LIF), et leurs niveaux variaient avec la modulation d'ATG7 (Kraya et al., 2014).

Néanmoins, le rôle de l'autophagie est contextuel. L'inhibition diminue la sécrétion d'IL-6 dans certaines lignées de cancer du sein mais l'augmente dans d'autres (Maycotte et al., 2015). Cette modulation de l'activité sécrétoire de l'autophagie peut être liée au maintien des CSC (Maycotte et al., 2014).

### *2.7) Cellules souches cancéreuses*

L'autophagie joue un rôle essentiel dans le maintien des cellules souches cancéreuses (CSC), tant au niveau de leur survie que de leur pluripotence. Ces cellules, responsables de l'hétérogénéité tumorale et de la plasticité phénotypique, sont également à l'origine des récidives et de la dissémination métastatique (Lobo et al., 2007; Nazio et al., 2019). Dans le cancer du sein, les CSC (phénotype $CD44^{+}/CD24^{-}$/low) présentent un flux autophagique accru par rapport aux autres cellules tumorales, associé à une surexpression de protéines clés comme Beclin-1 et ATG4, leur conférant une capacité élevée à former des mammosphères et à survivre en conditions défavorables (Cufí et al., 2011; C. Gong et al., 2013).

L'autophagie intervient également dans la régulation de voies de signalisation majeures impliquées dans le maintien du caractère souche, telles que les voies EGFR/STAT3, TGF-β/SMAD, ou encore *via* la sécrétion autocrine d'IL-6, facteur crucial pour l'homéostasie des CSC (Maycotte et al., 2015; Yeo et al., 2016). De plus, des sous-populations de carcinome canalaire mammaire in situ présentant une forte capacité migratoire dépendent d'une autophagie active pour maintenir leur phénotype de cellule souche (Cufí et al., 2011; C. Gong et al., 2013).

L'inhibition de l'autophagie, par la rapamycine ou l'inactivation d'ATG7, entraîne une perte de pluripotence des CSC, induisant leur différenciation ou leur entrée en sénescence (Sharif et al., 2017). Ce phénomène a également été observé dans le médulloblastome, où l'autophagie est indispensable non seulement au maintien du potentiel souche, mais aussi aux capacités

invasives des CSC (Nazio et al., 2021). Ces observations soulignent le rôle central de l'autophagie comme régulateur de l'état souche tumoral, au carrefour de la survie, de la plasticité et de la progression métastatique.

### 2.8) Dormance cellulaire

La dormance métastatique correspond à un état non prolifératif et quiescent des cellules tumorales disséminées, capable de persister pendant des années après le traitement du cancer primaire (Aguirre-Ghiso, 2007; Sosa et al., 2014; Gawrzak et al., 2018). Ces cellules dormantes partagent des caractéristiques avec les CSC, notamment leur capacité à rester en veille prolongée avant de réactiver un programme prolifératif. L'autophagie joue un rôle central dans le maintien de cette dormance, en assurant la survie cellulaire par la fourniture de nutriments essentiels (acides aminés, ATP) en contexte de stress, notamment lors de la privation de facteurs de croissance (Z. Lu et al., 2008; E. White, 2012; Sosa et al., 2014). Par ailleurs, elle contribue à l'induction de la quiescence *via* l'activation de l'axe LKB1–AMPK–ULK1–p27^KIP1, palliant ainsi les effets délétères du stress nutritionnel qui, en l'absence de p27, conduit à l'apoptose (J. Liang et al., 2007).

Au-delà de son rôle de soutien métabolique, l'autophagie participe activement à la répression de la colonisation métastatique. Des modèles de cancer du sein ont ainsi montré que l'inhibition de gènes clés de l'autophagie, tels que *Atg3* ou *Atg5*, conduit à une sortie prématurée de dormance, à une prolifération accrue de CSC et à une reprise de la croissance métastatique (Aqbi et al., 2018; La Belle Flynn et al., 2019). Cette perte d'autophagie est par ailleurs associée à une instabilité génomique accrue, notamment par l'apparition de cellules polyploïdes proliférantes (Debnath et al., 2023). Ainsi, l'autophagie s'impose comme un mécanisme essentiel à la fois pour le maintien de la dormance tumorale et pour la prévention de la progression métastatique.

### 2.9) Transcription des gènes de l'autophagie

Les protéines de l'autophagie et de la biogenèse lysosomale peuvent être transcrits par TFEB. Celui-ci est le plus important des facteurs de transcription pour l'autophagie. Son activation et sa localisation subcellulaire dépendent de son état de phosphorylation. TFEB est inhibé par

phosphorylation par mTORC1, ce qui retient TFEB dans le cytoplasme, le rendant inactif. Lors d'une privation nutritionnelle, l'inactivation de mTORC1 favorise la translocation nucléaire de TFEB (Roczniak-Ferguson et al., 2012). De plus, AMPK phosphoryle TFEB sur trois résidus sérine, permettant son activation (Paquette et al., 2021). Une fois activé, TFEB induit l'autophagie et contribue la croissance tumorale, la migration et la formation de métastases. Son expression est augmentée dans différents cancers (pancréas, colon, poumon) et est associé à la malignité tumorale et au mauvais pronostic. La perte de d'expression de TFEB dans les cellules de glioblastome ou du cancer du pancréas sensibilise les cellules tumorales aux traitements (Mitrakas et al., 2018; B. Zhao et al., 2020).

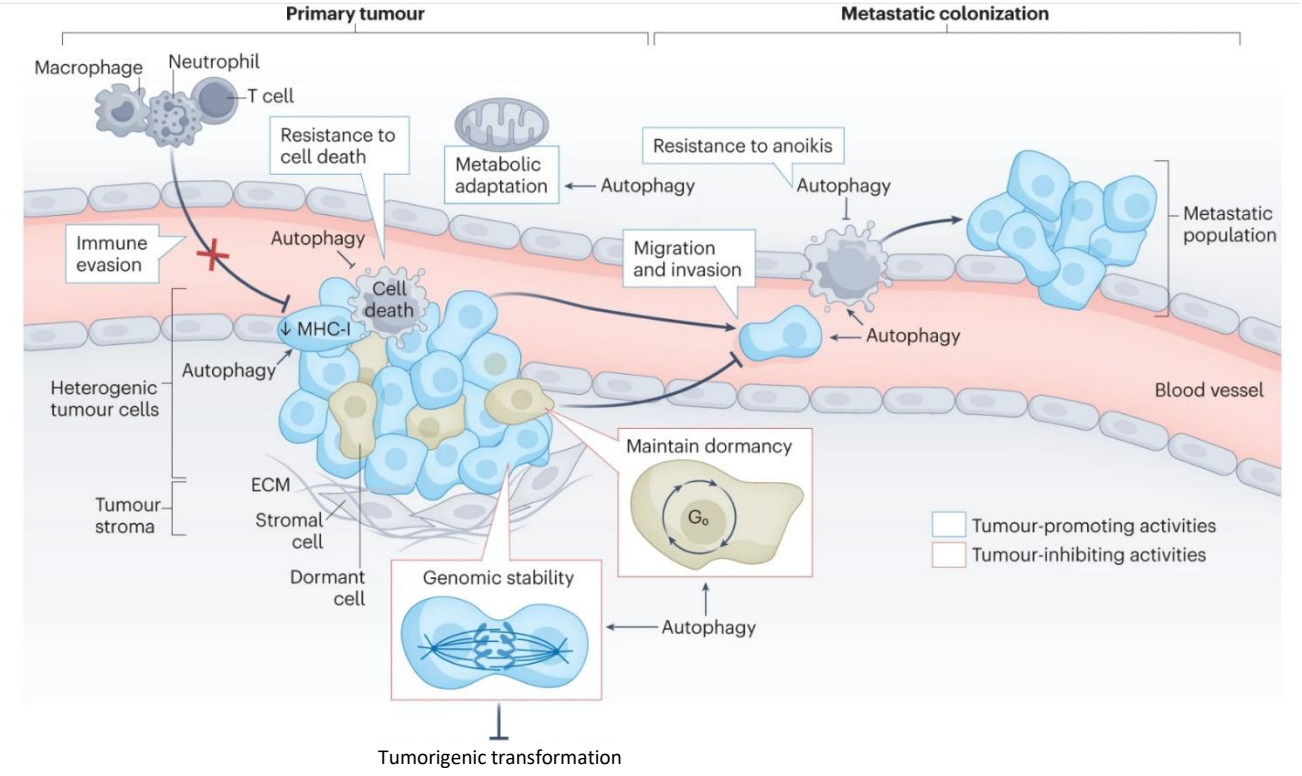



***Figure 29 : Rôle de l'autophagie dans la progression tumorale***

*L'autophagie contribue à la croissance et à la survie des cellules tumorales en facilitant leur adaptation métabolique, notamment par l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles, et en permettant l'échappement immunitaire, via la dégradation du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Au cours des métastases, l'autophagie joue des rôles contrastés. Elle peut favoriser la résistance à l'anoïkis chez les cellules circulantes ou détachées, et soutenir l'adaptation aux carences nutritionnelles. À l'inverse, elle est également impliquée dans le maintien de la dormance tumorale, ainsi que dans la préservation de la stabilité génomique (Debnath et al., 2023).*

## D. Autophagie et CBNPC

Comme décrit précédemment, l'autophagie joue un double rôle dans la tumorigenèse, pouvant aussi bien inhiber que favoriser le développement tumoral. Cette ambivalence est également observée au sein des CBNPC, tant au cours de la progression tumorale que dans la réponse aux traitements.

### 1) Développement tumoral

L'autophagie facilite la progression du CBNPC par la régénération du pool énergétique et de nutriments conduisant à la croissance tumorale. Un haut niveau d'autophagie est associé à une augmentation des capacités invasives des cellules tumorales ainsi qu'à des stades plus avancés de la maladie (Y. Ren et al., 2021). L'autophagie favorise le microenvironnement tumoral des CBNPC en répondant aux besoins métaboliques des CSC, des CAFs mais aussi de l'angiogenèse et de la matrice extracellulaire (Mukhopadhyay et al., 2022). Les CSC pulmonaires activent l'autophagie pour dégrader p53 favorisant l'expression de ZEB1 et augmente la capacité d'auto-renouvellement des CSC (J. Wang et al., 2021). Toutefois, l'augmentation du flux autophagique ne concerne pas seulement les cellules tumorales mais aussi les cellules stromales, notamment les CAF. Ces derniers facilitent la dissémination métastatique des cellules de CBNPC (C. Chen et al., 2023). L'autophagie de l'hôte en plus de celle des cellules tumorales, contribue au développement tumoral. En effet, dans un model murin présentant une déplétion pour le gène autophagique *Atg7*, une inhibition de l'autophagie est constatée induisant un effet antitumoral (Karsli-Uzunbas et al., 2014). Toutefois, Rao et al ont découvert que l'inactivation du gène essentiel à l'autophagie *Atg5* dans un modèle murin de carcinogenèse de CBNPC induit par KRAS, accélère les phases précoces de la tumorigenèse (Rao et al., 2014), montrant ici la complexité de la dualité de l'autophagie. Dans un autre contexte, les processus autophagiques peuvent également être régulés par l'histone méthyltransférase, EHMT2 (Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 2). Sa forte expression favorise la croissance tumorale *via* l'activation de l'autophagie. L'inhibition de EHMT2 entraine également une inhibition de l'autophagie dépendante du métabolisme du cholestérol induisant la mort des cellules tumorales (H. Kim et al., 2020). De plus, l'oncogène SKIL (Ski-like Oncogene), un médiateur de la voie de

signalisation TGF-β, induit l'autophagie *via* TAZ permettant la progression tumorale ainsi que l'échappement immunitaire dans les CBNPC (F. Ma et al., 2020).

De nombreux gènes altérés dans les CBNPC sont en relation avec l'autophagie. En effet, des mutations dans les gènes de *KRAS, EGFR, PTEN* ou encore *LKB1* peuvent être à l'origine d'une dérégulation de la voie mTORC qui est hautement impliquée dans la régulation de l'autophagie.

Par exemple, la sérine/thréonine kinase suppressive de tumeur, LKB1, régule négativement le complexe mTOR. L'expression de LKB1 est diminuée dans les CBNPC favorisant la croissance tumorale *via* l'axe LKB1/AMPK/mTOR (L. Dong et al., 2013). Cette activation de mTOR conduit à l'inhibition de l'autophagie, favorisant le développement tumoral. De plus, dans un modèle GEMM (Genetically Engineered Mouse Model) de cancer bronchique induit par une mutation *KRAS*, l'autophagie favorise la survie des cellules tumorales par le maintien et le renouvellement du pool de nucléotides préservant l'équilibre énergétique cellulaire (J. Y. Guo et al., 2016). Dans un autre contexte, les tumeurs induites par la mutation *BRAF* V600E, présentent aussi une dépendance à l'autophagie. Celle-ci favorise le fonctionne mitochondriale en fournissant un apport constant de substrats nécessaires au métabolisme énergétique et à la croissance cellulaire (Strohecker et al., 2013b).

### 2) Formation de métastases issues de CBNPC

L'autophagie est également impliquée dans la l'essaimage des cellules de CBNPC. En effet, une surexpression de la protéine PINK1 dans les CBNPC induit une activation de l'autophagie favorisant la migration des cellules tumorales (X. Lu et al., 2020). Une autre étude a montré que le miR-21 régule positivement l'autophagie *via* l'activation de AMPK/ULK1 engendrant l'invasion et la formation de métastases lymphatiques (S. Li et al., 2018). Certains polymorphismes des gènes de l'autophagie pourraient également être lié à l'agressivité des CBNPC. C'est le cas du gène de *ATG16L1* dont son variant ATG16L1-v300 est associé à un risque plus élevé de métastases d'origine bronchique (Q. Li et al., 2017).

### 3) Rôles suppresseurs de tumeur de l'autophagie dans les CBNPC

Une répression de l'autophagie est également observée dans les CBNPC. L'inhibition de l'autophagie dans les cellules de CBNPC peut, dans certains cas, favoriser la formation de métastases (W. Guo et al., 2022). De plus, une diminution de la protéine Beclin-1 est associée à un mauvais pronostic des patients atteints de CBNPC (H. Du et al., 2020; L. Jiang et al., 2014; X. Wang et al., 2015). Il a aussi été observé que TGF-β1 induit la TEM par l'inhibition de l'autophagie (H. Wang et al., 2018). L'expression de la cytokine CXCL2, induit également un blocage de l'autophagie et une activation de la voie PI3K/mTOR engendrant la TEM et la formation de métastases (H. Xu et al., 2023). De plus, l'activité de TSTA3 (Tissue Specific Transplantation Antigen P35B), une GDP-L-fucose synthase, est augmentée dans les cancers du poumon. TSTA3 régule à la baisse des protéines lysosomales telle que LAMP2A, inhibant ainsi l'autophagie. Ce mécanisme induit alors un phénotype migratoire et invasif aux cellules tumorales bronchiques (Y. Guo et al., 2023).

### 4) Autophagie et résistance aux traitements

L'autophagie peut, dans certain cas, être un mécanisme permettant aux cellules tumorales de survivre aux conditions de stress induites par la chimiothérapie ou la radiothérapie, amenant à une résistance aux traitements (J. G. Lee et al., 2015). Il a été démontré que l'autophagie participe à la résistance au cisplatine, agent de chimiothérapie couramment utilisé dans les CBNPC (C. Li et al., 2021). Dans les cellules tumorales bronchiques H460 et A549, le cisplatine induit une autophagie cytoprotectrice. Une inhibition de celle-ci améliore l'effet cytotoxique du cisplatine, favorisant l'apoptose (Shi et al., 2016). Plusieurs études impliquent l'activation de l'autophagie comme mécanisme adaptatif des cellules tumorales dans la résistance au cisplatine.

Par ailleurs, la troponine C1 engendre l'autophagie par l'activation facteur de transcription FOXO3, qui régule l'expression de gènes autophagique, amenant à une chimiorésistance à la gemcitabine (X. Ye et al., 2020). Tandis que la Claudine-1 induit l'autophagie *via* l'activation de la kinase ULK1, conduisant également à une résistance aux traitements (Z. Zhao et al., 2017).

De manière plus générale, l'inhibition de l'autophagie semble être une stratégie thérapeutique pour surmonter la résistance aux traitements. En effet, différentes études ont démontré qu'une approche combinant agents chimiothérapeutiques et inhibiteur de l'autophagie permettrait une meilleure réponse au traitement. L'utilisation de la chloroquine, un inhibiteur de l'autophagie, prévient la résistance au paclitaxel, réduisant la formation de métastases dans les CBNPC (Datta et al., 2019). Alors que dans les tumeurs avec des mutations *KRAS* et *LKB1*, la résistance au trametinib peut être contournée par l'ajout d'un inhibiteur de l'autophagie, induisant une mort par ferroptose des cellules tumorales (Bhatt et al., 2023). Il est également observé que certains traitements, bien qu'efficaces pour induire l'apoptose, ils activent aussi une autophagie cyctoprotective. C'est le cas de l'Anlotinib dont l'effet pro-apoptotique est contre balancer par l'induction d'une autophagie cytoprotective. L'inhibition de celle-ci favorise la cytotoxicité du traitement et potentialise la propriété anti-angiogénique de l'anlotinib (L. Liang et al., 2019). De plus, le miR142-3p peut de potentialiser l'efficacité du cisplatine par l'inhibition de l'autophagie (Y. Chen et al., 2017). Cependant l'inhibition de l'autophagie n'a d'intérêt que si celle-ci est cytoprotective envers les cellules tumorales.

Dans le contexte de la radiothérapie, l'autophagie joue également un rôle dans la résistance des cellules de CBNPC. Dans les lignées A549 et H460, la radiothérapie augmente l'activité cytoprotectrice de l'autophagique, prévenant ainsi des dommages induits. L'inhibition d'ATG5 et de Beclin-1, deux acteurs importants de l'autophagie, induit une radiosenbilisation des cellules tumorales (Saintigny & Burger, 2012).

### 5) L'autophagie comme acteur dans la sensibilisation aux traitements

L'autophagie favorise également la sensibilisation des cellules tumorales aux thérapies. Sharma et al, ont démontré que l'activation de l'autophagie par la vitamine D améliore la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie mais aussi à la radiothérapie (Sharma et al., 2015). Wang et al., ont mis en évidence qu'une thérapie combinée utilisant la rapamycine et l'acide saberoylonilide hydroxamique induit l'autophagie qui, ajoutée au traitement favorise la radiosensibilité des cellules tumorales (L. Wang & Wang, 2015).

Les voies de l'autophagie et de l'apoptose peuvent être reliées. L'autophagie peut, dans certaines circonstances, déclencher l'apoptose ou la mort autophagique des cellules tumorales bronchiques. En effet, certains traitements favorisent ces processus de mort

cellulaire (Y.-C. Xiang et al., 2021; S. Liu et al., 2023). La protéine NIPBL (Nipped B Like), fréquemment surexprimée dans les tissus tumoraux et associée à un pronostic défavorable, réprime l'autophagie. Lors de l'inhibition de NIPBL, une altération de la réponse aux dommages à l'ADN est observée ainsi que l'induction de l'autophagie potentialisant les effets des agents chimiothérapeutiques et engendrant l'apoptose (Zheng et al., 2018). Dans un modèle murin, la combinaison de radiothérapie avec une surexpression de Beclin-1 conduit à la mort cellulaire autophagique diminuant grandement l'accroissement tumorale (J.-Y. Shin et al., 2012). Dans une autre étude, l'inhibition des protéines pro-apoptotique BAX et BAK réduit la voie de signalisation mTOR/AKT, en augmentant l'expression du complexe ATG5-ATG12 favorisant l'autophagie. Ce mécanisme améliore la radiosensibilité des tumeurs pulmonaires (K. W. Kim et al., 2009; Moretti et al., 2007). Une autre stratégie thérapeutique combinant pémétrexed et sildénafil entraine une régulation négative des HDAC dépendante de l'autophagie amenant à la mort des cellules tumorales bronchiques (Booth et al., 2017).

Ces différents exemples illustrent la complexité et l'ambiguïté du rôle de l'autophagie dans le développement tumoral et sa progression ainsi que dans la réponse aux traitements. Afin de mieux appréhender l'implication de l'autophagie dans ces paramètres au sein des CBNPC, Chen et al, ont proposer un modèle de score de l'autophagie en mettant en relation les mutations des gènes liés à l'autophagie et le pronostic clinique des patients atteints de CBNPC. Ce score pourrait être un biomarqueur, susceptible d'orienter les stratégies thérapeutiques de CBNPC (Z. Chen et al., 2022). Toutefois, il n'existe pas de système fiable et complet pour évaluer de manière standardisée l'activité autophagique dans les échantillons humain (sanguin, tumoraux). Cette limite empêche l'évaluation de la régulation de l'autophagie dans le cadre d'essais cliniques. Néanmoins, l'étude des mécanismes sous-jacents régissant l'autophagie est nécessaire afin de mieux comprendre son potentiel rôle thérapeutique dans les CBNCP.

## E. Autophagie et la voie de signalisation Hippo

La voie de signalisation Hippo est impliquée dans les processus autophagiques dans divers contextes. Les interactions entre la voie Hippo et l'autophagie sont bidirectionnelles et complexes, chacune pouvant moduler l'activité de l'autre. Ces régulations influencent le flux autophagique dans l'homéostasie cellulaire mais aussi dans la tumorigenèse (*Figure 30*).

Les kinases MST1/2 peuvent induire ou réprimer l'autophagie selon le contexte :

- Activation de l'autophagie : MST1/2 phosphorylent la protéine LC3 sur la thréonine 50, une modification cruciale pour la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Shrestha et al., 2020; Wilkinson et al., 2015). Leur déplétion entraîne une accumulation d'agrégats protéiques, signe d'un blocage du flux autophagique. La perte de RASSF1A, activateur de MST1, inhibe l'autophagie en empêchant l''activation de MST1 (W. Li et al., 2019).
- Inhibition de l'autophagie : MST peut phosphoryler Beclin-1 sur la thréonine 108 dans son domaine BH3, inhibant la formation du complexe Beclin-1-Vps34 tout en favorisant l'interaction Beclin-1-Bcl-2 amenant à l'apoptose (E. F. Lee et al., 2019; Maejima et al., 2013).

Les kinases NDR régulent aussi l'autophagie par plusieurs mécanismes :

- LATS1 favorise l'ubiquitination de Beclin1, restreignant l'autophagie dans le carcinome hépatocellulaire (F. Tang et al., 2019).
- LATS1/2 interagissent avec le complexe mTORC1 en phosphorylant Raptor, réprimant l'activité de mTORC1 et activant potentiellement l'autophagie (Gan et al., 2020).
- NDR1/2 ont des fonctions différentes selon le contexte :
    - NDR1 régule l'export nucléaire de Beclin1 via phosphorylation d'Exportin-1 (XPO1) sur la sérine 1055 (A. P. Martin et al., 2019). NDR1 favorise la formation du complexe PI3KC3. notamment par son activation induite ULK1 (Joffre et al., 2015). Elle permet également la formation du complexe Beclin-1-Exo84-VPS34 médié par ULK1 (Joffre et al., 2016). Ces processus conduisent à l'activation de l'autophagie.
    - NDR1 régule l'autophagie sélective assistée par chaperon (CASA). NDR1 participe à la dégradation des protéines endommagées, mais peut aussi inhiber la CASA de manière kinase-indépendante (Ulbricht et al., 2013; Klimek et al., 2019).
    - NDR1/2 peuvent activer mTORC1, limitant la formation des autophagosomes (Amagai et al., 2015). Toutefois, elles favorisent le bon

trafic membranaire favorisant l'autophagie dans les neurones (Roşianu et al., 2023).

- NDR1/2 facilite la mitophagie, contribuant au contrôle qualité mitochondrial (Z. Wu et al., 2013).

Le rôle spécifique de NDR2 dans l'autophagie, détaillé dans la section "Résultats - Partie II", ne sera pas abordé de nouveau ici.

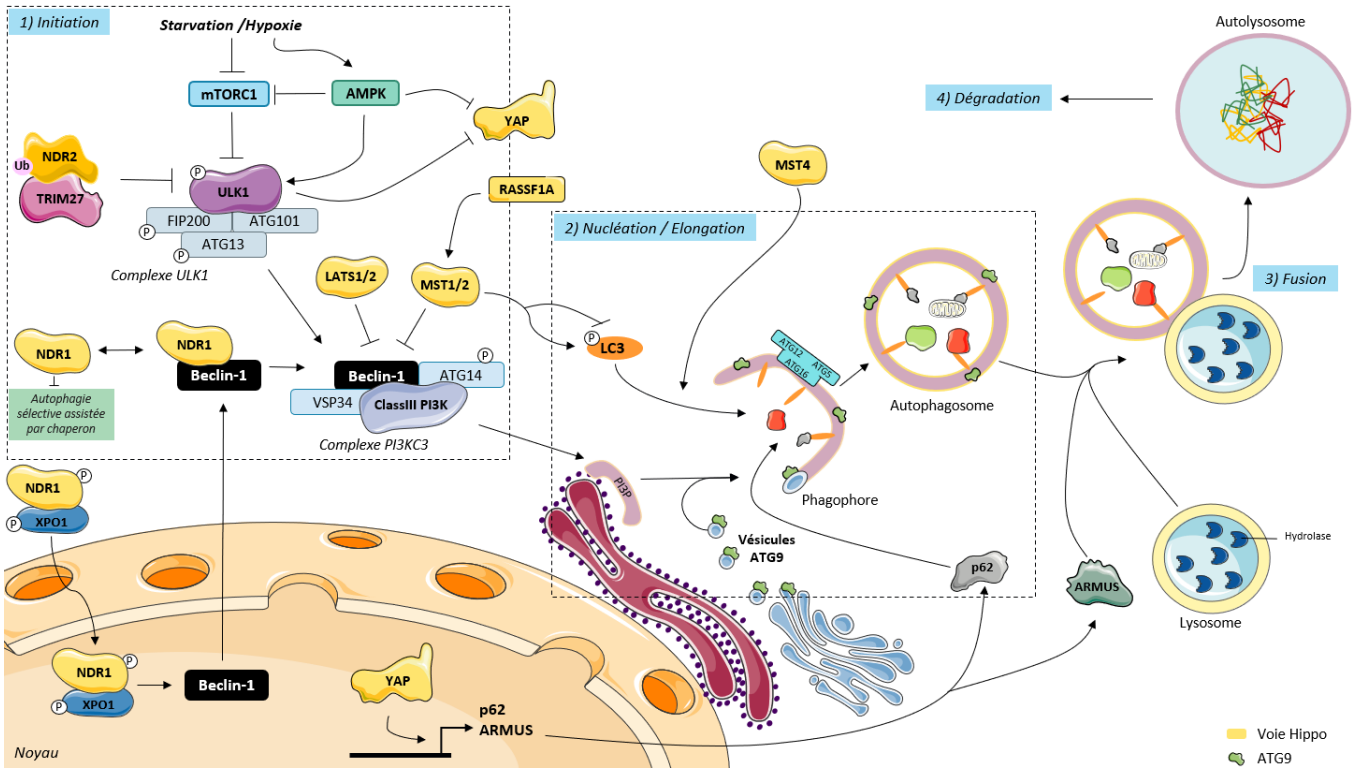



***Figure 30 : Action des différentes membranes de la voie Hippo dans le processus autophagique***

*MST1/2 peuvent activer l'autophagie en phosphorylant LC3 sur la thréonine 50, favorisant ainsi la fusion entre autophagosomes et lysosomes. Leur inhibition ou la perte de RASSF1A (activateur de MST1) bloque cette fusion, entraînant une accumulation de cargos non dégradés. À l'inverse, MST1 peut aussi réprimer l'autophagie via la phosphorylation de Beclin-1 sur la thréonine 108, inhibant son interaction avec Vps34 et favorisant son association avec Bcl-2, menant à l'apoptose. MST4 favorise l'activité de LC3.*

*LATS1/2 favorise l'ubiquitination de Beclin-1, restreignant l'autophagie. LATS1/2 peuvent également réprimer mTORC1 induisant l'autophagie.*

*NDR1 participe à l'activation de l'autophagie en favorisant l'export nucléaire de Beclin-1 par phosphorylation de XPO1, et en stimulant la formation des complexes PI3KC3. NDR1 régule aussi l'autophagie sélective assistée par chaperon en facilitant la dégradation des protéines endommagées, mais peut également agir comme inhibiteur de ce processus, indépendamment de son activité kinase.*

*NDR2 réprime l'autophagie par son interaction avec TRIM27 entrainant une inhibition de ULK1.*

*YAP-1 peut être inhiber par différent acteur de l'autophagie (AMPK, ULK1). YAP-1 favorise l'expression de p62 et ARMUS conduisant à la formation des autophagosomes et à la fusion avec les lysosomes.*

Les co-activateurs transcriptionnels YAP-1 et TAZ, effecteurs terminaux de la voie Hippo, sont largement impliqués dans l'autophagie. Leurs interactions avec ce processus sont étroites et réciproques, suggérant un dialogue dynamique et bidirectionnel.

**YAP-1/TAZ comme inducteurs de l'autophagie**

YAP-1 est impliqué dans l'induction de l'autophagie, notamment via le lncRNA-ATB (C.-Z. Wang et al., 2019) et l'activation transcriptionnelle d'ATG5 (T. Sun et al., 2021). Inversement, l'autophagie peut restreindre l'activité de YAP-1 par dégradation sélective. Ainsi, la délétion d'ATG7 dans les hépatocytes induit une accumulation de YAP-1, favorisant la transformation maligne, un effet annulé par la suppression simultanée de YAP-1 (Y. A. Lee et al., 2018). Dans le CBNPC, TAZ est requis pour l'autophagie induite par l'oncogène SKIL (F. Ma et al., 2020). Le cisplatine, en activant l'autophagie, réduit la phosphorylation de YAP-1, augmentant sa stabilité (Y. Jiang et al., 2017), tandis que son inhibition accroît la sensibilité à ce traitement (Xiao et al., 2016). YAP-1 stimule également l'autophagie dans le glioblastome via l'induction de HMGB1 (M. Zhao et al., 2021), et participe à la survie des cellules en condition d'inhibition de contact en régulant les gènes de la myosine II et de l'actine F (Pavel et al., 2018).

**YAP-1/TAZ comme inhibiteurs de l'autophagie**

Dans d'autres contextes, YAP-1 exerce une fonction inhibitrice. Dans les sarcomes et les cellules endothéliales, il supprime l'autophagie, induisant la sénescence (Rivera-Reyes et al., 2018). Son inhibition déclenche une mort cellulaire autophagique et potentialise les effets de la chimiothérapie (Y. Zhou et al., 2019). Ce rôle s'exerce notamment par la répression de PTEN et l'activation de la voie AKT/mTOR (W. Xu et al., 2021), ou encore par l'induction de Bcl-2 (L. Jin et al., 2021). Par ailleurs, la perte de TAZ active l'autophagie et réduit les capacités de migration et d'invasion cellulaire (Zhou et al., 2019).

**Régulation de YAP-1 par l'autophagie**

L'autophagie module également les niveaux de YAP-1. L'inhibition du flux autophagique par activation de mTOR entraîne son accumulation (Pavel et al., 2021). L'α-caténine, un inhibiteur de YAP-1, devient un substrat de l'autophagie lorsqu'elle est fortement exprimée, permettant ainsi le maintien de YAP-1. En revanche, lorsque son niveau est bas, c'est YAP-1 lui-même qui devient cible de l'autophagie (Y. A. Lee et al., 2018). Les contraintes mécaniques comme le

cisaillement perturbé favorisent également l'autophagie et inhibent YAP-1 (Yuan et al., 2020), tandis que dans les cellules endothéliales rénales, le flux urinaire active YAP-1/TAZ, ce qui réprime l'autophagie (Claude-Taupin et al., 2023).

**Rôle transcriptionnel de YAP-1 dans l'autophagie**

Sur le plan transcriptionnel, YAP-1 contrôle l'expression de gènes impliqués dans la machinerie autophagique et lysosomale, modulant ainsi sa propre activité via une boucle de rétrocontrôle dépendante de l'intégrité du flux autophagique (Pavel et al., 2022). Il induit notamment ARMUS, un RAB-GAP essentiel à la fusion autophagosome–lysosome (Totaro et al., 2019), et HMGB, qui libère Beclin-1 de l'inhibition par Bcl-2 (D. Tang et al., 2010; M. Zhao et al., 2021). YAP-1 forme également des complexes avec TFEB ou TEAD, stimulant l'expression de gènes autophagiques et lysosomaux dans différents types cellulaires (Song et al., 2015; Ikeda et al., 2021).

## II – NDR2 régule la migration des cellules cancéreuses du poumon non à petites cellules en cas de famine en soutenant la biogenèse des autophagosomes par la régulation de LC3 et d'ATG9A

Le rôle de la voie Hippo dans la régulation de l'autophagie dans le CBNPC demeure encore peu exploré, nous nous intéressons ici à l'implication à de la kinase NDR2 dans ce processus, en particulier dans la prolifération et la migration des cellules de CBNPC en condition de privation nutritive.

# NDR2 regulates non-small cell lung cancer cell migration under starvation by supporting autophagosome biogenesis through LC3 and ATG9A regulation

Tiphaine Biojout[1], Emmanuel Bergot[1,2], Jasmine Taylor[1], Dimitri Leite Ferreira[1,2], Nathalie Colloc'h[1], Marc Riffet[1,3], Nicolas Elie[4,5], Maelle Guyot[5], Céline Bazille[1,3], Jérôme Levallet[1], Guénaëlle Levallet[1,3]

1- Université de Caen Normandie, CNRS, Normandie Université, ISTCT UMR6030, GIP CYCERON, F-14000 Caen, France

2- Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique, 14000 CAEN, France.

3- Centre Hospitalier Universitaire de Caen, Service d'Anatomie et Cytologie pathologiques, 14000 CAEN, France.

4- Université de Caen Normandie, Service Unit EMERODE, Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, CMABio³, F-14000 Caen, France.

5- Université de Caen Normandie, Federative Structure 4207 "Normandie Oncologie", Service Unit PLATON, Virtual'His platform, F-14000 Caen, France.

***Corresponding author**

Guénaëlle Levallet, ISTCT-UMR6030, Avenue H.Becquerel, 14074 Caen, France.

Phone: + 33 2 31 47 02 54; Fax: +33 2 31 06 50 63; E-mail: guenaelle.levallet@unicaen.fr

**ABSTRACT**

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is characterized by the deregulation of the Hippo kinase NDR2 and high basal autophagic activity. NDR2 promotes autophagy-driven tumor growth in some cancers, but evidence in lung cancer is lacking. Human bronchial epithelial tumor cell (HBEC) lines H2030, H2030-BrM3, and H1299, with or without NDR2 depletion via siRNA or shRNA, were cultured for up to 24 hours in the presence or absence of serum, and with or without the autophagosome–lysosome fusion inhibitor chloroquine (CQ). Autophagosome biogenesis, migration and Golgi apparatus functionality were analyzed. Serum deprivation of HBECs silences the expression of NDR1 but not NDR2. As shown by the increased expression of the autophagosome marker LC3-II, NDR2 participates to the formation and distribution of phagophores/autophagosomes in HBECs in an ATG9A-dependent manner. NDR2 is required for cargos degradation since its depletion disrupts lysosomal trafficking and/or fusion with autophagosomes. Finally, NDR2 silencing inhibits filopodia formation and cell polarization during HBEC migration under serum deprivation by disrupting Golgi repositioning to the leading edge, a process essential for cell migration. These data highlight NDR2's role in Golgi- and autophagy-regulated migration during starvation. Unlike NDR1, NDR2 is stabilized under starvation and promotes autophagy by regulating LC3 and ATG9A, thereby supporting NSCLC cell proliferation and migration. Routine staining for NDR2 and/or ATG9 could aid in diagnosing NSCLC with high migratory potential.

**KEYWORDS:** NSCLC, metastasis, NDR2, autophagy, Golgi orientation, migration

**ABBREVIATION:** ATG3: autophagy-related protein 3; ATG8: autophagy-related protein 8; ATG9A: autophagy-related protein 9A; BECN1: beclin-1; Co-IP: co-immunoprecipitation; CQ: chloroquine; FBS: fetal bovin serum; HBEC: human bronchial epithelial tumor cell; LAMP1 : lysosome-associated membrane glycoprotein 1; LC3: microtubule-associated protein light chain; MST1/2/3: mammalian sterile 20 (Ste20)-like kinase 1/2/3; NDR2: nuclear Dbf2-related 2; NSCLC: non-small cell lung cancer; SQSTM1/p62: sequestosome 1; TAZ: transcriptional co-activator coactivator with PDZ-binding motif; TFEB: transcription factor EB; YAP-1 : yes-associated protein 1

## INTRODUCTION

Macroautophagy (hereafter autophagy) is a conserved lysosomal degradation process that maintains cellular homeostasis by removing damaged organelles and proteins [1,2]. Its dysregulation is linked to cancer [3]. In tumors, autophagy suppresses initiation by clearing defective components and inducing cell death [4,5], yet under stress (e.g., hypoxia, matrix detachment), it promotes tumor growth and metastasis [6–9].

Non-small cell lung cancer (NSCLC), representing approximately 85% of lung cancer cases, exhibits elevated basal autophagy that supports tumor growth and survival [10–12]. NSCLC is characterized by activation of nuclear Dbf2-related kinase 2 (NDR2) and the transcriptional coactivator YAP-1, both key components of the Hippo pathway [13,14], which promotes tumor progression by enhancing cell migration and brain metastasis formation [14,15].

The involvement of NDR2 in autophagy has been established in neurodegenerative diseases and osteoclastogenesis [16,17], but remains poorly characterized in cancer. Notably, while NDR2 regulates autophagy in breast cancer [18,19], its role in NSCLC remains unexplored. However, the Drosophila homolog of NDR1/2 interacts with autophagy-related protein 8 (ATG8), the mammalian LC3 equivalent [20]. Additionally, the mammalian autophagy protein ATG9A harbors a phosphorylation motif targeted by NDR2 [21,22]. Since ATG9A is critical for early autophagosome biogenesis—delivering lipids and proteins to phagophore initiation sites via vesicular trafficking from the Golgi and endosomes [23–30]—it is plausible that NDR2 regulates ATG9A localization or activity.

Here, we demonstrate that NDR2, but not NDR1, is expressed in starved human bronchial epithelial tumor cells (HBECs) and promotes autophagy through regulation of LC3 and ATG9A. This NDR2-mediated autophagic activity enhances HBEC proliferation and migration, implicating NDR2 as a key modulator of autophagy in NSCLC progression.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

We selected a retrospective cohort of 45 patients who underwent surgery for nonmetastatic NSCLC (n = 25) or metastatic NSCLC (n = 20) at Caen University Hospital between December 2009 and December 2019, with both primary tumor and brain metastasis samples available. Among the 25 localized NSCLC patients, 17 were men and 8 women, with a mean age of 71 years (range 54–86). Among the 20 metastatic NSCLC patients, 15 were men and 5 women, with a mean age of 67 years (range 40–82). All patients gave informed consent, and the study was approved by the institutional ethics committee, in accordance with French law (North-west-Committee-for-Persons-Protection-III No. DC-2008-588).

### Cell culture transfection and treatments

The H1299 (CRL-5803) and H2030 (CRL-5914) lung adenocarcinoma cell lines were obtained from ATCC, while the brain-tropic H2030-BrM3 line was kindly provided by Dr. Joan Massagué (MSKCC, USA). All cells were cultured in high-glucose DMEM (4.5 g/L) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 2 mM L-glutamine (Gibco). Stable shRNA-depleted lines for NDR1 and NDR2 (shNDR1, shNDR2), along with a control line (shCtr), were used for H1299 and H2030-BrM3, as described [15]. siRNA duplexes (Eurogentec®, Table S1) or plasmids (kindly provided by Dr. Alexander Hergovich, University College London) were transfected using JetPrime (Polyplus, 101000046) following the manufacturer's protocol at 40% cell confluence. Transfection efficiency was routinely confirmed by RT–PCR and/or Western blot.

For FBS starvation, cells were cultured for 24 hours at 37°C and 5% $CO_2$ in low-glucose DMEM (1000 mg/L) without FBS, supplemented with antibiotics and antimycotics.

For some experiments, chloroquine (CQ) was added at 10 µM to the culture medium for up to 24 hours.

**Preparation of RNA and RT-PCR**

Total RNA was extracted using the ReliaPrep™ RNA Miniprep System (Promega) per the manufacturer's protocol. Reverse transcription was performed on 250 ng RNA with random primers and 200 IU M-MLV reverse transcriptase at 37°C for 90 minutes, followed by inactivation at 70°C for 5 minutes (Mastercycler, Eppendorf®). cDNA was diluted 1:10 and used for qPCR on an Mx3005P system (Agilent Technologies) with 5 pmol primers and iQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). S16 was the internal control; positive and no-RT controls were included. Gene expression was quantified using the ΔΔCt method. The primers used are listed in Table S2.

**Antibodies, immunofluorescence staining, immunoblotting, Immunoprecipitation**

The antibodies used are listed in Table S3.

For immunofluorescence, $2\times10^4$ cells were seeded on coverslips in 24-well plates, washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (20 min, 37°C), and permeabilized with methanol (10 min, –20°C). After blocking with 4% BSA in PBS for 1 hour, cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies. Alexa-488 or Alexa-555 secondary antibodies (ThermoFisher Scientific) were applied for 1 hour at room temperature. Nuclei were counterstained with DAPI

(Fluoromount-GTM, Invitrogen). Imaging was performed on an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope (60×, NA 1.20).

For immunoblotting, whole-cell extracts were prepared as described [14]. Proteins were separated by SDS-PAGE and detected with primary antibodies (1:1000) in TBS-T (0.1% Tween-20), HRP-conjugated secondary antibodies, and Clarity Western ECL (Bio-Rad). Signals were captured with an Odyssey Fc imager (Li-COR®) and quantified using ImageJ. GAPDH was used as a loading control.

Immunoprecipitation was carried out on extracts from T75-flask cultures using the Pierce Co-IP Kit (Thermo Scientific, 26149) following the manufacturer's protocol.

Immunohistochemistry (IHC) was performed on 3 µm FFPE sections using the Discovery Ultra Ventana analyzer. After deparaffinization and antigen retrieval (Tris-EDTA buffer, pH 8.2), sections were incubated with anti-NDR2 (1:200), anti-ATG9 (1:100), and anti-MST3 (1:200). Denaturation was done with Ultra CC2 (Ventana, #950-223, 8 min, 100°C). For co-staining, HRP-conjugated secondary antibodies were detected using DISC. CY5 and FITC Kits (Ventana, #253-4928, #253-4881). Nuclei were counterstained with DAPI (Ventana, #760-4196).

**Autophagy assay**

The CYTO-ID® Autophagy Detection Kit (Enzo Life Sciences, ENZ-51031-0050) was used following the manufacturer's instructions. Cells on glass coverslips were treated with 10 µM CQ for 24 hours prior to CYTO-ID staining. Images were acquired with an Olympus FluoView FV1000 confocal microscope and analyzed using ImageJ.

**LysoTracker staining**

LysoTracker™ Green DND-26 (50 nM; Cell Signaling Technology, 8783) was added to the culture medium. Live-cell imaging was performed immediately using a Leica DMi8 inverted microscope in a temperature- and $CO_2$-controlled chamber (37°C, 5% $CO_2$). Images from three fields were captured with Metamorph 7.8.13.0 and analyzed using ImageJ.

**Wound-healing assay**

Transfected cells were seeded on collagen I-coated plates or collagen IV-coated plates, grown to confluence, and treated with mitomycin C (1 µg/mL) for 12 h to inhibit proliferation. Cells were then incubated in either full media or starvation media, with or without CQ at 10 µM. A scratch was made with a P-10 pipette tip (0 h), and migration was monitored for 20 h. Images were captured every 15 min using a ZEISS AXIO Observer 7 microscope equipped with a motorized stage, temperature-controlled chamber (37°C, 5% $CO_2$, PECON) and a Hamamatsu ORCA FLASH 4 camera. Cell movements were tracked with a custom Python script using Cellpose and Trackpy libraries.

**Statistical analysis**

Data are shown as means ± SEM from three independent experiments. Statistical significance ($p < 0.05$) was assessed using two-tailed Student's t-test or one-way ANOVA with Tukey's post hoc test, via GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, USA).

**RESULTS**

**Serum deprivation for 24 hours reduces NDR1 but not NDR2 in HBECs**

HBEC cell lines (H2030, H2030-BrM3, and H1299) at 60–70% confluence (avoiding YAP-1 inhibition due to overconfluence) were cultured without fetal bovine serum (FBS) for 24 hours (deprivation) to induce autophagy [31]. Such starvation reduced cell density (**Fig. S1A**), but no apoptotic features were observed; rather the decrease was attributable to reduced cell proliferation, as indicated by Ki67 staining (**Fig. S1A/B/C**). HBECs are thus resistant to 24 h of FBS deprivation even if they proliferate less under these culture conditions.

To assess the effect of starvation on NDR1 and NDR2, we measured their mRNA and protein expression levels. Starvation did not alter NDR1 or NDR2 mRNA levels (**Fig. 1A/B**) but reduced NDR1 protein expression across all cell lines (**Fig. 1C**). Conversely, NDR2 protein levels increased depending on the cell line (**Fig. 1D**). Next, we depleted NDR2 expression in HBECs using siRNA or shRNA to determine whether NDR1 compensates for the loss of NDR2 function in HBECs cultured under FBS starvation conditions (**Fig. 1B/ D**). Combined with serum deprivation, NDR2 depletion reduces NDR1 protein levels (**Fig. 1C**) but not its mRNA expression (**Fig. 1A**).

We then investigated whether NDR2 functions through the canonical Hippo pathway mechanism, that is, whether it is activated by MST kinases and regulates YAP-1 activity. During FBS starvation of H2030, NDR2 was not activated by the Hippo kinase MST, since FBS starvation silenced MST1 and MST3 but not MST2 (**Fig. S2A**). Starvation alone did not change YAP-1 nuclear localization but affected target gene expression variably (**Fig. S3AB/C**). Silencing NDR2 reduced YAP-1 nuclear localization similarly to starvation (not significant in H2030 cells), and combining NDR2 depletion with starvation did not produce an additive effect (**Fig. S3A**), suggesting FBS deprivation activates NDR2 via a noncanonical Hippo pathway to regulate YAP-1.

**NDR2 promotes autophagy induction by increasing LC3-II levels in HBECs**

We tested whether NDR2 is involved in autophagy in HBECs. Treatment of H2030 cells with chloroquine (CQ, 10 µM) for 24 hours, an inhibitor of autophagosome-lysosome fusion [32], increased autophagosome numbers (**Fig. 2A/B**). After CQ treatment, cells were subjected to 24 hours of FBS starvation, which further increased autophagosome numbers (**Fig. 2B**). However, NDR2 depletion tended to reduce autophagosome numbers in HBECs under both starvation and non-starvation conditions and significantly lowered them in CQ-treated HBECs (**Fig. 2A/B**). Notably, the autophagosome increase induced by combined CQ and starvation was absent in NDR2-depleted cells (**Fig. 2A/B**).

Analysis of LC3, a key marker of autophagosome formation with LC3-II conversion indicating autophagy induction [33], showed decreased mRNA (**Fig. S4A**) and protein levels (**Fig. 2C/D/E/J**) upon NDR2 depletion, both under standard conditions and during starvation. The decrease in LC3 expression resulting from NDR2 silencing correlated with fewer LC3 puncta detected via immunofluorescence (**Fig. S4B/C**), indicating that the loss of NDR2 influenced the number of autophagosomes under serum deprivation conditions. In addition, NDR2 depletion decreased the protein expression of LC3 and LC3-II but only under starvation conditions (**Fig. 2C/D/E/J**). However, no difference was observed in LC3-II**:**LC3-I ratios (**Fig. 2 E/F**), suggesting that NDR2 was not involved in LC3 lipidation. During the 24h starvation period, LC3 and LC3-II expression transiently decreased within the first 3h, followed by an increase indicating autophagy activation (**Fig. 2G/H**). In NDR2-depleted cells, this increase occurred only after 6h and remained lower than in controls (**Fig. 2G/H**). These findings suggest that NDR2 contributed to the regulation of autophagic mechanisms, by modulating LC3 expression during starvation (**Fig. 2E/F/G/H, Fig. S4A**).

NDR2 seemed more involved in serum deprivation-induced autophagy than in basal autophagy in HBECs, unlike NDR1, whose loss did not affect LC3 expression during serum starvation (**Fig. S4E/F**). The LC3 expression induced by NDR2 under starvation conditions may occur through the indirect activation of YAP1 by NDR2 (**Fig. S3D/E**).

SQSTM1/p62, a cargo degradation mediator whose levels decrease during autophagy [34,35], showed increased mRNA expression following deprivation in HBECs (**Fig. S4D**). NDR2 depletion did not influence *SQSTM1/p62* mRNA levels in H2030 cells, but decreased these levels in H2030-BrM3 cells (**Fig. S4D**). SQSTM1/p62 protein levels decreased in H2030 cells during deprivation, consistent with autophagosome degradation, but increased upon NDR2 silencing regardless of FBS presence (**Fig. 2I**). In H2030-BrM3 cells, SQSTM1/p62 levels were similar under serum and starvation conditions but NDR2 silencing decreased protein expression in both conditions (**Fig. 2J**), strengthening the hypothesis that NDR2 is involved in autophagy in HBECs.

To assess whether NDR2 influences autophagy through transcription factor EB (TFEB), a key regulator of autophagy-related genes, we measured the expression of selected TFEB target genes. In HBECs, we observed no variation in the expression of TFEB target genes (*ATG3, ATG9, LAMP1, BECN1*) attributable to NDR2 (**Fig. S4G/H**).

**NDR2 prevents the accumulation of lysosomes and aggregates in HBECs**

Following NDR2 silencing, an increase number of cells with large pericentriolar vacuolar structures was observed (**Fig. 3A/B**). With LysoTracker labeling, these structures were identified as primarily lysosomes (**Fig. 3A**). As observed with TEM, NDR2 depletion in HBECs induced the accumulation of much larger hyperdense structures than did NDR2

depletion in control (si*Neg*) cells (**Fig. 3C**), suggesting impaired cargo degradation and disrupted lysosomal trafficking or autophagosome fusion.

NDR2 kinase is essential for autophagy but does not directly interact with autophagosomes. Labeling of NDR2 and SQSTM1/p62 in H2030 cells revealed their proximity but no strict colocalization (**Fig. 3D**).

**The shift in ATG9A subcellular localization in HBECs depends on NDR2**

**ATG9A** is a transmembrane protein found in the trans-Golgi network (TGN), endosomes, and autophagosomes [23,25] (**Fig. 4A**). Under serum starvation, ATG9A-positive vesicles fuse with phagophores, enabling their expansion into autophagosomes [23,25]. NDR2 silencing changed the subcellular localization of ATG9A under normal conditions in HBECs (**Fig. 4B/C, S5A/B**). ATG9A translocated from the TGN to the cytoplasm in HBECs after FBS starvation (**Fig. 4B/C**), consistent with the increased number of autophagosomes observed under these conditions. (**Fig. 2**). Serum-starvation-induced localization of ATG9A appears to require the presence of NDR2: in HBECs lacking NDR2, ATG9A is evenly distributed between the Golgi and the cytoplasm, whether cells are cultured in complete or serum-free medium (**Fig. 4B/C, S5A/B**). A colocalization of NDR2 with ATG9A was observed in H2030 cells with complete and starved medium, as in other HBECs (**Fig. S5C**), but not in cells transfected with siNDR2 or siATG9A as controls (**Fig. 4D/E**).

We previously showed that **NDR2** is more highly expressed in metastatic NSCLC [14]. In the same cohort (25 patients with localized NSCLC and 20 patients with metastatic NSCLC), **ATG9A expression appears to be higher, although not significantly, in metastatic NSCLC** (**Fig. 5A/B**). Consistent with our *in vitro* findings, the colocalization of NDR2 and ATG9A

reveals a close spatial relationship between these proteins, suggesting a potential functional interaction in NSCLC patients (**Fig. 5A**). Thus, NDR2 may contribute to ATG9A vesicle trafficking and phagophore biogenesis. This hypothesis was strengthened the presence of the NDR2 consensus phosphorylation motif (HxRxxS/T) [36] in the ATG9A sequence (**Fig. 4A**). Immunoprecipitation revealed an interaction between NDR2 and ATG9A consistent with substrate-enzyme relationship, suggesting that NDR2 may phosphorylate ATG9A to facilitate its trafficking (**Fig. 4F**).

NDR2 and ATG9A co-depletion increased SQSTM1/p62 levels and puncta under both FBS and starvation, without additive effects, suggesting an involvement in common mechanism in autophagic processes (**Fig. 4G/H/I/J**).

**NDR2 and ATG9A maintain the integrity of the Golgi apparatus**

NDR2 depletion disrupted Golgi structure in H2030 cells (**Fig. 6A**). We categorized Golgi architecture into three distinct states: condensed, extended, or fragmented (**Fig. 6B**). The Golgi apparatus was condensed or extended in control condition (**Fig. 6A/B**). Under both serum deprivation and non-deprivation conditions, NDR2 silencing increased Golgi fragmentation (**Fig. 6A/B**). ATG9A depletion also caused Golgi fragmentation but to a lesser extent, with no additive effect seen during combined NDR2-ATG9A silencing. In contrast, FBS deprivation alone led to Golgi condensation (**Fig. 6B**). Golgi fragmentation was also observed with CQ treatment, suggesting that defects in autophagy may underlie fragmentation seen with NDR2 and/or ATG9A loss. (**Fig. 6**).

**NDR2-ATG9A control H2030 cells migration properties**

A wound-healing assay was conducted after 24 hours of serum deprivation or culture in complete medium, followed by cell migration under the same respective conditions. Six hours after wound healing, we quantified the number of HBECs exhibiting Golgi orientation toward the wound edge, indicative of directional migration [37]. Golgi orientation was defined as the apparatus positioned within a 90° angle from the nuclear center toward the wound [37,38] **(Fig. 7A**). During starvation, the reorientation of the Golgi toward the migration front decreased in HBECs (**Fig. 7B/C, S6A/B, S7A/B**), which coincided with the decrease in the cell migration velocity (**Fig. 8A**, **S8**). NDR2 or ATG9A silencing decreased the number of cells with the Golgi apparatus positioned toward the migration front under all conditions (**Fig. 7B/C**), consistent with the decrease in migration speed observed in the presence or absence of serum for H2030 (**Fig. 8A**).

Although MST3 was not expressed under starvation conditions (**Fig. S2**), its involvement in NDR2 activation and cell migration [39–41] led us to investigate this Golgi-associated kinase. Despite its stronger perinuclear/Golgi localization in metastatic versus localized NSCLC samples (**Fig. S2B**), MST3 did not affect Golgi structure or localization in H2030 cell (**Fig. S2C/D**). NDR2 effects on the Golgi was independent of its activation by MST3.

FBS deprivation before and after wounding reduced migration speed and shifted cells from collective to individual migration in HBECs (**Fig. S6A/B, S7A/B, S8**). Cells subjected to starvation followed by FBS replenishment (Starvation+FBS) migrated at similar speeds to those maintained in complete medium, except for H1299 cells, which migrated faster. However, this increase was absent upon inhibition of NDR2 (**Fig. S7**), which reduces filopodia formation by modifying the actin cytoskeleton without affecting vimentin or tubulin organization (**Fig.**

**S7D/E/F**). No cytoskeletal changes were observed in other HBECs, while cell area decreased under serum deprivation (**Fig. 8B/C, S6D**).

NDR2 depletion reduced H2030 cell migration regardless of FBS availability (**Fig. 8A**). ATG9A silencing impaired migration only under FBS deprivation, while combined NDR2-ATG9A depletion decreased migration in all conditions (**Fig. 8A, S8**). Inhibition of autophagy by CQ reduced the migration rate of H2030 cells both in the presence and absence of FBS, indicating that autophagy contributed to the migratory capacity of these cells. NDR2 depletion alone results in a decrease comparable to that observed in siNeg cells treated with CQ. Moreover, CQ treatment of NDR2-depleted cells did not further enhance this effect. Similar results are observed following ATG9A depletion, either alone or in combination with NDR2 depletion (Fig. **8A**). These findings suggested that NDR2 and ATG9A jointly promote cell migration under both nutrient-deprived and FBS-supplemented conditions, likely through the regulation of autophagy.

NDR2 and/or ATG9A loss also reduced membrane-associated N-cadherin, which accumulated perinuclear region (**Fig. 8D/F**).

**DISCUSSION**

Consistent with the high basal autophagy in NSCLCs [44] and previous findings [47], we demonstrate here that HBECs tolerate 24h of serum starvation. Moreover, we reveal that NDR1 is not involved in autophagy in HBECs and highlight a novel role for NDR2 kinase in bronchial carcinogenesis, specifically in autophagy initiation and autophagy-dependent migration. Indeed, while NDR1 regulates autophagosome formation in other models [44,47], its expression is silenced in serum-starved HBECs, unlike NDR2. Moreover, NDR1 does not compensate for NDR2 silencing by siRNA or shRNA under these conditions. Thus, NDR2

appears to be the key NDR kinase controlling autophagy in HBECs. This supports previous reports [14,22,48,49] indicating that NDR1 and NDR2 have non-redundant, and possibly opposing roles. Additional experiments are required to clarify: (i) the mechanism responsible for NDR1 degradation without affecting NDR2 in serum-starved HBECs, and (ii) how NDR2 activity is increased under these conditions. One possible explanation for NDR1 silencing is SOCS2, a starvation-induced E3 ligase that ubiquitinates NDR1 and triggers its degradation in mouse fibroblasts [49,50]. Regarding NDR2 expression in serum-starved HBECs, our data indicate that its regulation is independent of Hippo MST kinases, as both MST1 and the NDR2-specific MST3 are then silenced. Instead, NDR2 may be activated *via* noncanonical pathways, such as MAP4K4, which promotes autophagy through SOX6 [51], or through SIRT1 [52], a key autophagy regulator [53].

Here, we show that once activated, NDR2 regulates autophagy through an indirect mechanism involving LC3 and ATG9A, further underscoring its oncogenic role. Similar to other NDR kinases (e.g., LATS1/2, NDR1), NDR2 regulates all proteins containing the HxRxxS/T motif [35], including YAP1 and TAZ, thereby influencing cell proliferation and survival [51], as well as additional substrates—not all yet identified—that support its diverse roles in both healthy and tumor cells [21], particularly during hypoxia and metastatic dissemination in NSCLC. NDR2 is essential for autophagosome formation in HBECs, as its silencing reduces autophagosome numbers and promotes aggregate formation. NDR1/2 knockout lowers LC3 levels in neurons, but NDR2's specific role in LC3 regulation remains unclear, unlike NDR1 [16]. In this study, we observed a decrease in LC3 expression in serum-starved HBECs following the depletion of NDR2, which could be one of the reasons for the observed reduction in autophagosome formation in HBECs. The regulation of LC3 by NDR2 does not depend on TFEB activity but could be mediated by YAP-1. Indeed, LC3 can also be transcribed by YAP-1 [64] and c-JUN [67], two transcription factors whose activity is promoted by NDR2 in

hypoxic NSCLC cells [14]. YAP-1 activity decreased upon NDR2 loss in both serum-deprived and non-serum-deprived HBECs. The use of siYAP-1 resulted in a decrease in LC3 mRNA expression under deprivation conditions, with no additive effect observed when NDR2 and YAP-1 were simultaneously depleted, suggesting a novel regulatory axis of LC3 expression *via* NDR2-YAP-1. NDR2 also appears to transcriptionally regulate SQSTM1/p62 in a cell line-dependent manner, as its depletion reduces SQSTM1/p62 mRNA levels—but only in H2030-BrM3 cells. This finding supports the notion that NDR2 regulates a transcription factor involved in autophagy.

NDR2 regulates the subcellular localization of ATG9A, which plays a crucial role in early phagophore formation. Loss of NDR2 leads to ATG9A maldistribution and Golgi fragmentation. Golgi disruption impairs autophagy by affecting lipid and protein supply, as well as disrupting ATG9A vesicle trafficking [21,66-68]. This observation aligns with Rosianu et al., who reported ATG9A peripheral localization and impaired autophagy in neurons following NDR1/2 knockout in mice [16]. Another mechanism may exist, as ATG9A contains an NDR2 phosphorylation motif. NDR2 could directly interact with ATG9A to promote its trafficking, potentially through the actin network [69], with which NDR2 also interacts, and via adaptor protein (AP) complexes, thereby enhancing autophagy [70]. Additional experiments are necessary to elucidate the precise mechanisms by which NDR2 may facilitate ATG9A vesicular trafficking and autophagosome biogenesis.

Autophagy influences cell migration in a context-dependent manner, either inhibiting it by regulating adhesions [71,72] or promoting it via adhesion disassembly and EMT notably in NSCLC [73,74]. Here, we showed that NDR2 and ATG9A are both involved in the localization of the Golgi apparatus in HBECs. NDR2 and/or ATG9A silencing disrupts the reorientation of the Golgi apparatus toward the leading edge of the cell in migration assays. Migrating cells establish polarity by reorienting the Golgi toward the leading edge, enabling targeted secretion

that promotes cancer cell migration, invasion, and metastasis [37,75]. Improper Golgi reorientation disrupts the accumulation of cytoskeletal elements at the wound site and impairs the recycling of key migration components [76,77]. Under these conditions, the decrease in Golgi reorientation upon the depletion of NDR2 and/or ATG9A and the decrease in autophagy under these same conditions could impact the renewal and recycling of focal adhesion plaques and integrins and, consequently, cell migration. In glioblastoma, ATG9A promotes integrin trafficking to enable tumor cell migration [78]. Similarly, NDR2 may facilitate integrin trafficking *via* ATG9A in HBECs, consistent with its reported role in integrin transport during neuronal development [61,62].

In conclusion, these data indicate that NDR2 has a novel role in autophagy in NSCLC cells under prolonged serum starvation by regulating LC3 and ATG9A. Additionally, the NDR2–ATG9A pathway enhances NSCLC cell migration during starvation. Further studies will be required to explore how the NDR2-ATG9A relationship interfaces with that of NDR2 and ULK1 [17, 18, 25, 27] during the autophagic process in healthy or tumor cells.

## DATA AVAILABILITY

All data supporting the findings of this study are available within the paper and its Supplementary Information. The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

## REFERENCES

1. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. Cell. 2011;147(4):728-41. doi: 10.1016/j.cell.2011.10.026.
2. Zhen Y, Stenmark H. Autophagosome Biogenesis. Cells. 2023;12(4):668. doi: 10.3390/cells12040668

3. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. Cell. 2008;132(1):27-42. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.018.
4. Russell R, Guan K-L. The multifaceted role of autophagy in cancer. EMBO J. 2022;41(13):e110031. doi: 10.15252/embj.2021110031.
5. Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Perrone M, Mantovani C, Anania A et al. Understanding the Role of Autophagy in Cancer Formation and Progression Is a Real Opportunity to Treat and Cure Human Cancers. Cancers. 2021;13(22):5622. doi: 10.3390/cancers13225622
6. Peng Y-F, Shi Y-H, Shen Y-H, Ding Z-B, Ke A-W, Zhou J et al. Promoting Colonization in Metastatic HCC Cells by Modulation of Autophagy. Plos One. 2013;13;8(9):e74407. doi: 10.1371/journal.pone.0074407
7. Mowers E, Sharifi M, Macleod K. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis. FEBS J. 2017;285(10):1751–1766. doi: 10.1111/febs.14388
8. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. Mol Cell. 2010;40(2):280-93. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.023.
9. Fung C, Lock R, Gao S, Salas H et Debnath J. Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. Mol Biol Cell. 2008;19(3):797–806. doi: 10.1091/mbc.E07-10-1092
10. Guo J, Xia B, White E. Autophagy-Mediated Tumor Promotion. Cell. 2013;155(6):1216–1219. doi: 10.1016/j.cell.2013.11.019
11. Guo J, Teng X, Laddha S, Ma S, Van Nostrand S, Yang Y et al. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. Genes Dev. 2016;30(15):1704-17. doi: 10.1101/gad.283416.116
12. Wang D, He J, Huang B, Liu S, Zhu H et Xu T. Emerging role of the hippo pathway in autophagy. Cell Death Dis. 2020 Oct 20;11(10):880. doi: 10.1038/s41419-020-03069-6
13. Dubois F, Keller M, Calvayrac O, Soncin F, Hoa L, Hergovich A et al. RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. Cancer Res. 2016;76(6):1627-40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1008
14. Levallet J, Biojout T, Bazille C, Douyère M, Dubois F, Leite Ferreira D et al. Hypoxia-induced activation of NDR2 underlies brain metastases from Non-Small Cell Lung Cancer. Cell Death Dis. 2023;14(12):823. doi: 10.1038/s41419-023-06345-3.

15. Keller M, Dubois F, Teulier S, Martin A, Levallet J, Mailler E et al. NDR2 kinase contributes to cell invasion and cytokinesis defects induced by the inactivation of RASSF1A tumor-suppressor gene in lung cancer cells. J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):158. doi: 10.1186/s13046-019-1145-8
16. Roşianu F, Mihaylov S, Eder N, Martiniuc A, Claxton S, Flynn H R et al. Loss of NDR1/2 kinases impairs endomembrane trafficking and autophagy leading to neurodegeneration. Life sci Alliance. 2022;6(2):e202201712. doi: 10.26508/lsa.202201712.
17. Kong X, Shan Z, Zhao Y, Tao S, Chen J, Ji Z et al. NDR2 is critical for osteoclastogenesis by regulating ULK1-mediated mitophagy. JCI Insight.2025; doi: 10.1172/jci.insight.180409.
18. Yang Y, Zhu Y, Zhou S, Tang P, Xu R, Zhang Y et al. TRIM27 cooperates with STK38L to inhibit ULK1-mediated autophagy and promote tumorigenesis. EMBO J. 2022;41(14):e109777. doi: 10.15252/embj.2021109777
19. Thorne R, Yang Y, Wu M, Chen S. TRIMming down autophagy in breast cancer. Autophgy. 2022;18(10):2512–2513. doi: 10.1080/15548627.2022.2105557
20. Tsapras P, Petridi S, Chan S, Geborys M, Jacomin A-C, Sagona A et al. Selective autophagy controls innate immune response through a TAK1/TAB2/SH3PX1 axis. Cell Rep. 2022;38(4):110286. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110286
21. Holzer E, Martens S, Tulli S. The Role of ATG9 Vesicles in Autophagosome Biogenesis. J Mol Biol. 2024;436(15):168489. doi: 10.1016/j.jmb.2024.168489.
22. Biojout T, Bergot E, Bernay B, Levallet G, Levallet J. NDR2 Kinase: A review of its physiological role and involvement in carcinogenesis. Int J Biol Macromol. 311(Pt 1):143656. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2025.143656
23. Orsi A, Dooley H, Robinson D, Weston A E, Collinson L M et Tooze S A. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. Mol Biol Cell. 2012;23(10):1860–1873. doi: 10.1091/mbc.E11-09-0746
24. Imai K, Hao F, Fujita N, Tsuji Y, Oe Y, Araki Y et al. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. J Cell Sci. 2016;129(20):3781-3791. doi: 10.1242/jcs.196196.

25. Zhou C, Ma K, Gao R, Mu C, Chen L, Liu Q et al. Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. Cell Res. 2017;27(2):184-201. doi: 10.1038/cr.2016.146.
26. Noda T. Autophagy in the context of the cellular membrane-trafficking system: the enigma of Atg9 vesicles. Biochem Soc Trans. 2017;45(6):1323-1331. doi: 10.1042/BST20170128
27. Young A, Chan E, Hu X, Köchl R, Crawshaw S, High S et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. J Cell sci. 2006;119(Pt 18):3888-900. doi: 10.1242/jcs.03172.
28. Mari M, Griffith J, Rieter E,Krishnappa L, Klionsky et Reggiori F. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. J Cell Biol. 2010;190(6):1005-22. doi: 10.1083/jcb.200912089.
29. van der Vaart A, Griffith J, Reggiori F. Exit from the Golgi Is Required for the Expansion of the Autophagosomal Phagophore in Yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell. 2010;21(13):2270–2284. doi: 10.1091/mbc.E09-04-0345.
30. Marcassa E, Raimondi M, Anwar T, Eskelinen E-L, Myers M, Triolo G et al. Calpain mobilizes Atg9/Bif-1 vesicles from Golgi stacks upon autophagy induction by thapsigargin. Biol Open. 2017;6(5):551–562. doi: 10.1242/bio.022806.
31. Pavel M, Renna M, Park S, Menzies F, Ricketts T, Füllgrabe J et al. Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. Nat commun. 2018; 9:2961. doi: 10.1038/s41467-018-05388-x.
32. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijkema K-J et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. Autophagy. 2018;14(8):1435-1455. doi: 10.1080/15548627.2018.1474314.
33. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. Int J Biochem Cell Biol. 2004;36(12):2503–2518. doi: 10.1016/j.biocel.2004.05.009.
34. Pankiv S, Clausen T, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H et al. p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy. J Biol Chem. 2007;282(33):24131-45. doi: 10.1074/jbc.M702824200.
35. Sahani M, Itakura E, Mizushima N. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. Autophagy. 2014;10(3):431–441. doi: 10.4161/auto.27344.

36. Hergovitch A. The Roles of NDR Protein Kinases in Hippo Signalling. Genes (Basel). 2016 May 18;7(5):21. doi: 10.3390/genes7050021.
37. Yadav S, Puri S, Linstedt A. A Primary Role for Golgi Positioning in Directed Secretion, Cell Polarity, and Wound Healing. Mol Biol Cell. 2009;20(6):1728–1736. doi: 10.1091/mbc.E08-10-1077
38. Dubois F, Alpha K, Turner C. Paxillin regulates cell polarization and anterograde vesicle trafficking during cell migration. Mol Biol Cell. 2017; 28(26):3815–3831. doi: 10.1091/mbc.E17-08-0488
39. Stegert M, Hergovich A, Tamaskovic R, Bichsel S et Hemmings B. Regulation of NDR Protein Kinase by Hydrophobic Motif Phosphorylation Mediated by the Mammalian Ste20-Like Kinase MST3. Mol Cell Biol. 2005;25(24):11019–11029. doi: 10.1128/MCB.25.24.11019-11029.2005.
40. Tang J, Ip J, Ye T, Ng Y-P, Yung W-H, Wu Z et al. Cdk5-Dependent Mst3 Phosphorylation and Activity Regulate Neuronal Migration through RhoA Inhibition. J Neurosci. 2014;34(22):7425–7436. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5449-13.2014.
41. Mardakheh F, Self A, Marshall C. RHO bonding to FAM65A regulates Golgi reorientation during cell migration. J Cell Sci. 2016;129(24):4466–4479. doi: 10.1242/jcs.198614.
42. Zhao M, Zhang Y, Jiang Y, Wang K, Wang X, Zhou D et al. YAP promotes autophagy and progression of gliomas via upregulating HMGB1. J Exp Clin Cancer Res. 2021;40(1):99. doi: 10.1186/s13046-021-01897-8.
43. Joffre C, Codogno P, Fanto M, et al. STK38 at the crossroad between autophagy and apoptosis. Autophagy. 2016;12(3):594–595. doi: 10.1080/15548627.2015.1135283.
44. Guo W, Du K, Luo S et Hu D. Recent Advances of Autophagy in Non-Small Cell Lung Cancer: From Basic Mechanisms to Clinical Application. Front Oncol. 2022;4:12:861959. doi.org/10.3389/fonc.2022.861959.
45. Dong S, Khoo A, Wei J, Bowser R, Weathington N, Xiao S, Zhang L, et al. Serum starvation regulates E-cadherin upregulation via activation of c-Src in non-small-cell lung cancer A549 cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2014;307(9):C893-9. doi: 10.1152/ajpcell.00132.2014.
46. Martin A, Jacquemyn M, Lipecka J,Chhuon C, Aushev V, Meunier B et al. STK38 kinase acts as XPO1 gatekeeper regulating the nuclear export of autophagy proteins and other cargoes. EMBO Rep. 2019;20(11):e48150. doi: 10.15252/embr.201948150.

47. Lu J, Feng Y, Li H, Li W, Chen H et Chen L. A review of nuclear Dbf2-related kinase 1 (NDR1) protein interaction as promising new target for cancer therapy. Int J Biol Macromol. 2024;259(Pt 1):129188. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.129188.
48. Jonischkies K, Del Angel M, Demiray YE, Zambrano A et Stork O. The NDR family of kinases: essential regulators of aging. Front Mol Neurosci. 2024 May 13:17:1371086. doi: 10.3389/fnmol.2024.1371086.
49. Liu X-Y, Lu R, Chen J, Wang J, Qian H-M, Chen G et al. Supressor of Cytokine Signaling 2 Regulates Retinal Pigment Epithelium Metabolism by Enhancing Autophagy. Front Neurosci. 2021;15:738022. doi: 10.3389/fnins.2021.738022
50. Paul I, Batth T, Iglesias-Gato D, Al-Araimi A, Al-Haddabi I, Alkharusi A et al. The ubiquitin ligase Cullin5$^{SOCS2}$ regulates NDR1/STK38 stability and NF-κB transactivation. Sci Rep. 2017;7:42800. doi: 10.1038/srep42800
51. Huang H, Han Q, Zheng H, Liu M, Shi S, Zhang T, et al. MAP4K4 mediates the SOX6-induced autophagy and reduces the chemosensitivity of cervical cancer. Cell Death Dis. 2021;13(1):13. doi: 10.1038/s41419-021-04474-1
52. Tang Y, Yu W. SIRT1 and p300/CBP regulate the reversible acetylation of serine-threonine kinase NDR2. Biochem Biophys Res Commun. 2019;518(2):396-401. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.069.
53. Patra S, Praharaj P, Singh A, et Bhutia S. Targeting SIRT1-regulated autophagic cell death as a novel therapeutic avenue for cancer prevention. Drug Discov Today. 2023;28(9):103692. doi: 10.1016/j.drudis.2023.103692.
54. Hergovich A, Stegert M, Schmitz D, Vichalkovski A, Cornils H et Hemmings B. NDR kinases regulate essential cell processes from yeast to humans. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009; 7(4):253-64. doi: 10.1038/nrm1891.
55. Schmitz-Rohmer D, Probst S, Yang Z-Z, Laurent F, Stadler M, Zuniga A et al. NDR Kinases Are Essential for Somitogenesis and Cardiac Looping during Mouse Embryonic Development. PLoS One. 2015;10(8):e0136566. doi: 10.1371/journal.pone.0136566.
56. Ma X., Wang D., Li N., Gao P, Zhang M et Zhang Y. Hippo kinase NDR2 inhibits IL-17 signaling by promoting Smurf1-mediated MEKK2 ubiquitination and degradation, Mol Immunol. 2019;105:131-136. doi.org/10.1016/j.molimm.2018.10.005.
57. Hergovich A, Lamla S, Nigg E, et Hemmings B. Centrosome-Associated NDR Kinase Regulates Centrosome Duplication. Mol Cell. 2007; 25(4):625-34. doi: 10.1016/j.molcel.2007.01.020.

58. Sagona A, Stenmark H. Cytokinesis and cancer. FEBS Lett. 2010; 584(12):2652-61. doi: 10.1016/j.febslet.2010.03.044.
59. Wang L, Dynlacht B. The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease. Development. 2018 ;145(18):dev151407. doi: 10.1242/dev.151407
60. Chiba S, Amagai Y, Homma Y, Fukuda M et Mizuno K. NDR2-mediated Rabin8 phosphorylation is crucial for ciliogenesis by switching binding specificity from phosphatidylserine to Sec15. EMBO J. 2013;32(6):874-85. doi: 10.1038/emboj.2013.32.
61. Rehberg K, Kliche S, Madencioglu D, Thiere M, Müller B, Meineke B et al. The Serine/Threonine Kinase Ndr2 Controls Integrin Trafficking and Integrin-Dependent Neurite Growth. J Neurosci. 2014 ;34(15):5342–5354. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2728-13.2014
62. Demiray Y, Rehberg K, Kliche S, et Stork O. Ndr2 Kinase Controls Neurite Outgrowth and Dendritic Branching Through α1 Integrin Expression. Front mol Neurosci. 2018;11:66. doi: 10.3389/fnmol.2018.00066
63. Lin C-W, Chang Y-L, Chang Y-C, Lin J-C, Chen C-C, Pan S-H et al. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. Nat Commun. 2013;4:1877. doi: 10.1038/ncomms2876
64. Claude-Taupin A, Isnard P, Bagattin A, Kuperwasser N, Roccio F, Ruscica B et al. The AMPK-Sirtuin 1-YAP axis is regulated by fluid flow intensity and controls autophagy flux in kidney epithelial cells. Nat Commun. 2023 Dec 5;14(1):8056. doi: 10.1038/s41467-023-43775-1.
65. Sun T, Li D, Wang L, Xia L, Ma J, Feng G et al. c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramide-induced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells. J Transl Med. 2011; 26:9:161. doi: 10.1186/1479-5876-9-161
66. Gosavi P, Houghton F, McMillan P, Hanssen E et Gleeson P. The Golgi ribbon in mammalian cells negatively regulates autophagy by modulating mTOR activity. J Cell Sci. 2018; 131(3):jcs211987. doi: 10.1242/jcs.211987.
67. Chang H-Y,Yang W Y. Golgi quality control and autophagy. IUBMB Life. 2022;74(4):361-370. doi: 10.1002/iub.2611.
68. Lamb C, Yoshimori T, Tooze S. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. Nat Rev Mol Cell biol. 2013;14(12):759-74. doi: 10.1038/nrm3696.

69. Choi J, Jang H, Xuan Z, et Park D. Emerging roles of ATG9/ATG9A in autophagy: implications for cell and neurobiology. Autophagy. 2024 ;20(11):2373-2387. doi: 10.1080/15548627.2024.2384349
70. Binotti B, Ninov M, Cepeda A P, Ganzella M, Matti U, Riedel D et al. ATG9 resides on a unique population of smal vesicles in presynaptic nerve terminals. Autophagy. 2023; 20(4):883–901. doi: 10.1080/15548627.2023.2274204
71. Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Collier C, Chen H, Zamora M et al. Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. Cell Rep. 2016 May 24;15(8):1660-72. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.065.
72. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ. 2011 Apr;18(4):571-80. doi: 10.1038/cdd.2010.191.
73. Deng H, Deng L, Chao H, Yu Z, Huang J, Song Z, et al. RAB14 promotes epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer through autophagy-dependent AKT signaling pathway. Cell Death Discov. 2023 Aug 9;9(1):292. doi: 10.1038/s41420-023-01579-8.
74. Alizadeh J, Glogowska A, Thliveris J, Kalantari F, Shojaei S, Hombach-Klonisch S, et al. Autophagy modulates transforming growth factor beta 1 induced epithelial to mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2018 May;1865(5):749-768. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.007.
75. MillarteV, Farhan H. The Golgi in Cell Migration: Regulation by Signal Transduction and Its Implications for Cancer Cell Metastasis. ScientificWorldJournal. 2012;2012:498278. doi: 10.1100/2012/498278
76. Bui S, Mejia I, Diaz B, et Wang Y. Adaptation of the Golgi Apparatus in Cancer Cell Invasion and Metastasis. Front Cell Dev Biol. 2021; 10:9:806482. doi: 10.3389/fcell.2021.806482.
77. Darido C, Jane S. Golgi Feels Its Own Wound. Adv Wound Care (New Rochelle) 2013;2(3):87–92. doi: 10.1089/wound.2011.0352
78. Campisi D, Desrues L, Dembélé K-P, Mutel A, Parment R, Gandolfo P, et al. The core autophagy protein ATG9A controls dynamics of cell protrusions and directed migration. J Cell Biol. 2022;221(3):e202106014. doi: 10.1083/jcb.202106014

**ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Dr Didier Goux, CMABio3 platform, US EMERODE for his contribution to the electron microscopy analyses.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conceptualization: TB, JL and GL; funding acquisition: EB and GL; project administration: EB, JL and GL; supervision: JL, EB and GL; validation: TB, EB, JT, DLF, NC, MR, NE, MG, CB, JL, and GL; writing—original draft: TB, JL, EB and GL; review and editing: TB, EB, JT, DLF, NC, MR, NE, CB, JL, and GL.

**COMPETING INTERESTS**

All authors declare no competing interests.

**ETHICS APPROVAL**

This work was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki. All patients gave informed consent, and the study was approved by the institutional ethics committee, in accordance with French law (North-west-Committee-for-Persons-Protection-III No. DC-2008-588).

**FUNDING**

Tiphaine Biojout benefits from a doctoral grant from the Région Normandie (RIN 100% PhD student, 2022). Jasmine Taylor benefits from a doctoral grant from the Fondation pour la Recherche Medicale (FRM, 2022). Research grants were provided from the Association des Insuffisants respiratoires (AIR) to G. Levallet (2020). This research was also funded by the

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Université Caen-Normandie (UNICAEN) and the Caen University Hospital.

## FIGURE LEGENDS

**Fig. 1.** NDR2 is expressed in HBECs grown in the absence of serum for 24 h, unlike NDR1.

NDR2 was silenced (si*NDR2* or sh*NDR2*) in H2030, H2030-BrM3 and H1299 cells, which were then deprived of FBS for 24 h; control cells were transfected with si*Neg* or sh*Ctr*. (**A**) *NDR1* mRNA expression. (**B**) *NDR2* mRNA expression. (**C**) NDR1 protein blot and quantification. (**D**) NDR2 protein blot and quantification. The cells were arrested at 80% confluence. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

**Fig. 2.** NDR2 promoted autophagosome production in H2030 or H2030-BrM3 cells subjected to serum deprivation for 24 h.

(**A**) H2030 cells were cultured in complete media (FBS) or starvation media (starvation) with or without DMSO or chloroquine (CQ) (10 µM) for 24 h and then treated with Cyto-ID. (**B**) Quantification of the intensity in (**A**). Blot showing LC3 and NDR2 levels in H2030 (**C**) and H2030-BrM3 (**D**) cells expressing or lacking NDR2 after 24 h of FBS deprivation. (**E**) Quantification of the blots in (**C**), including total LC3 expression, LC3-II expression and the LC3-II:LC3-I ratio, for H2030 cells. (**F**) Quantification of the blots in (**D**), including the expression of total LC3, expression of LC3-II and the LC3-II:LC3-I ratio, for H2030-BrM3 cells. (**G**) Blot showing kinetics of LC3 in H2030 and quantification of LC3 (**H**) and LC3-II (**I**) expression over 24h of starvation, with or without NDR2 depletion. Quantification of SQSTM1/p62 protein levels in H2030 (**J**) and H2030-BrM3 cells (**K**). Two-way ANOVA

followed Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

**Fig. 3.** NDR2 silencing induced the accumulation of lysosomes and aggregates in H2030 cells grown in the absence of serum for 24 h.

(**A**) Phase contrast and fluorescence images of H2030 cells expressing or lacking NDR2 showing lysosome labeling with LysoTracker (green). (**B**) Quantification of vacuolated cells after transfection with si*NDR2* and FBS deprivation for 24 h. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3, **p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001. (**C**) TEM images of H2030 cells transfected with either si*Neg* or si*NDR2* showing the accumulation of hyperdense structures. (**D**) Immunostaining for NDR2 and SQSTM1/p62 in H2030 cells upon serum deprivation for 24 h.

**Fig. 4.** NDR2 governs the subcellular localization of ATG9A in H2030 cells.

Immunolabeling (**A**) and quantification of ATG9A localization (**B**) upon FBS deprivation for 24 h, with or without NDR2 silencing, in H2030 cells. (**C**) Colocalization of NDR2 and ATG9A immunolabeling in H2030 cells under normal or serum-deprived conditions and transfection of si*NDR2* or si*ATG9A*. (**D**) Quantification of NDR2-ATG9A colocalization. (**E**) Structural diagram of ATG9A. ATG9A possesses the consensus NDR2 phosphorylation motif (HXRXXT) in its cytoplasmic domain. NDR2 or/and ATG9A (si*NDR2* or si*ATG9A*)-silenced or control (si*Neg*) H2030 cells were subjected to 24h of serum deprivation or control culture. Immunolabeling (**F**) and quantification of SQSTM1/p62 puncta (**G**). (**H**) SQSTM1/p62 protein levels and quantification. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

**Fig. 5.** ATG9A is expressed in NSCLC and colocalizes with NDR2.

(**A**) We immunostained a retrospective population of patients operated on a non-metastatic NSCLC (n=25) or metastatic NSCLC (n=20) for whom both the primitive tumor and the brain metastasis (BM) were available, with ATG9A (1:100) and we costained in fluorescence with NDR2 (1:200) and ATG9A (1:100). (**B**) Data are presented as the mean ± SEM of an IHC score, calculated by multiplying the staining intensity (0–3) by the distribution percentage (0–100%) and labeling localization.

**Fig. 6.** NDR2 and ATG9A prevented the fragmentation of the Golgi apparatus in H2030 cells.

(**A**) Immunolabeling of the Golgi with golgin-97 (green) in the H2030 cell line. (**B**) Diagram of the different classes of the Golgi identified in (**A**) (condensed, extended and fragmented) and quantification. A minimum of 150 cells were counted per experiment. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3, *$p<0.05$, **$p<0.01$ and ***$p<0.001$.

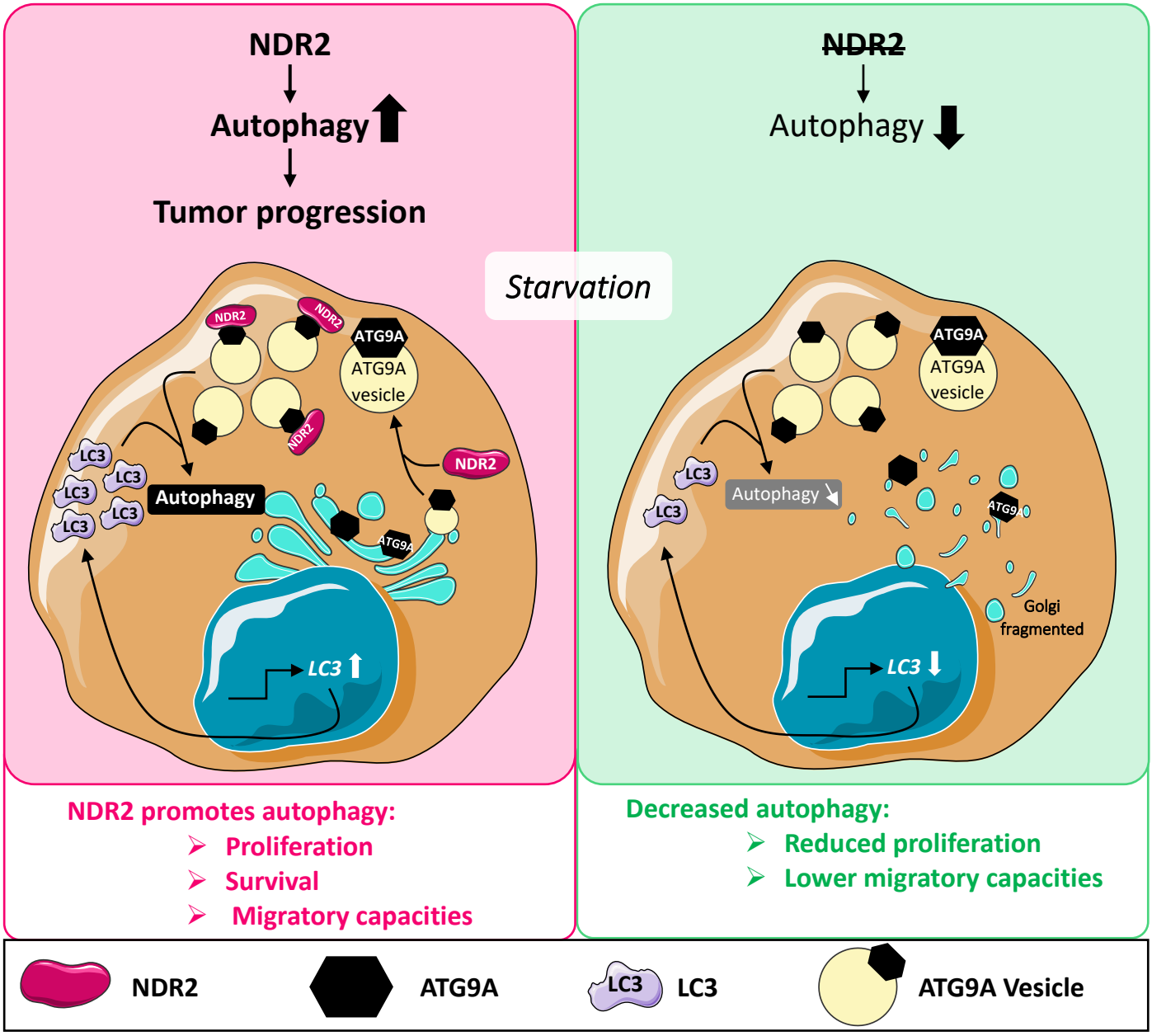
**Fig. 7.** NDR2 and ATG9A are required for the reorientation of the Golgi apparatus during migration.

(**A**) Schematic representation of the disposition of the Golgi in migrating cells. (**B**) Illustration of the position of the Golgi (red) during migration (t6 h), (+) indicates cells with Golgi apparatus oriented toward the wound, (–) indicates cells with non-oriented Golgi. (**C**) Quantification of cells with the Golgi oriented toward the migration front during serum deprivation with or without the loss of NDR2 or ATG9A. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test

were used to analyze the data, means ± SEMs, N=4, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

**Fig. 8.** FBS deprivation and the loss of NDR2 or ATG9A decreased the migration capacity of H2030 cells.

(**A**) Quantification of the wound-healing assay with H2030 cells with or without NDR2 and/or ATG9A silencing in full media or starvation media and with or without CQ. (B) Immunolabeling for phalloidin (green) and tubulin (red). (**C**) Quantification of the cell area using phalloidin labeling (**B**). (**D**) Immunolabeling of E-cadherin (green) and N-cadherin (red). (**E**) Quantification of the number of cells with N-cadherin membrane labelling and analysis via two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, means ± SEMs, N=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.




**Graphical abstract**

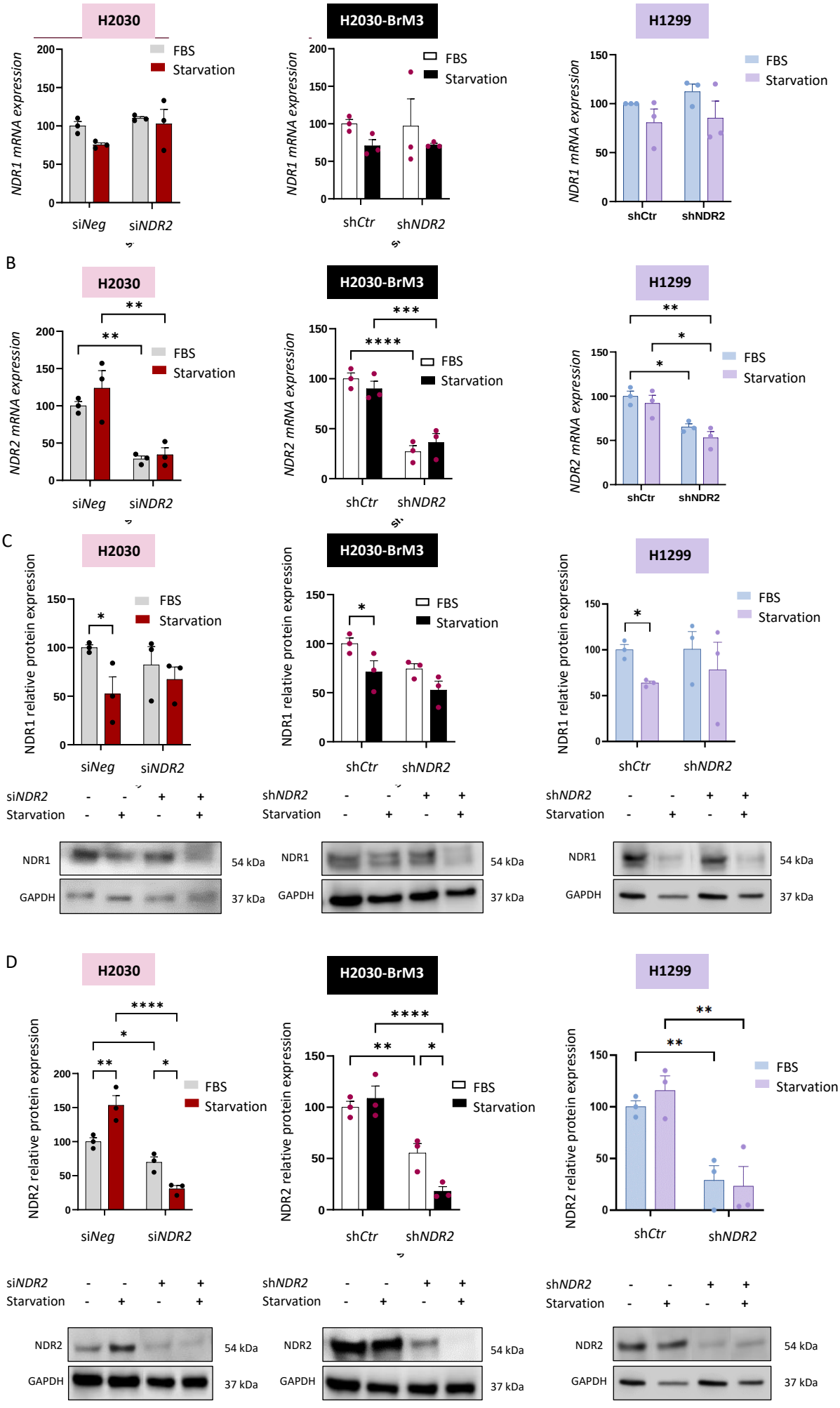
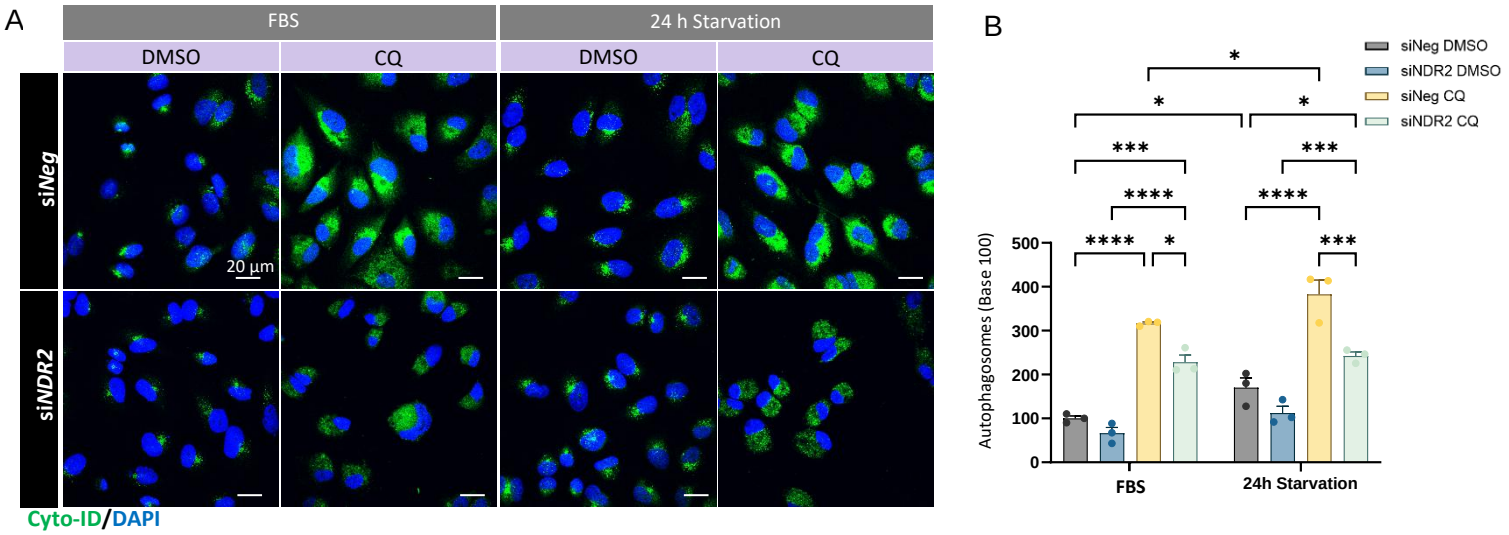
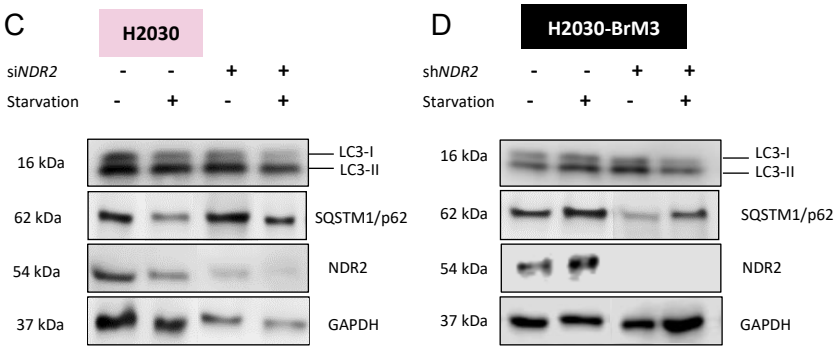
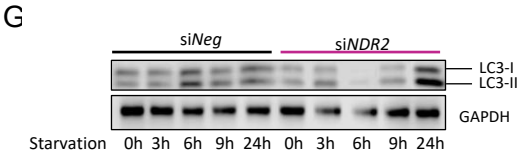
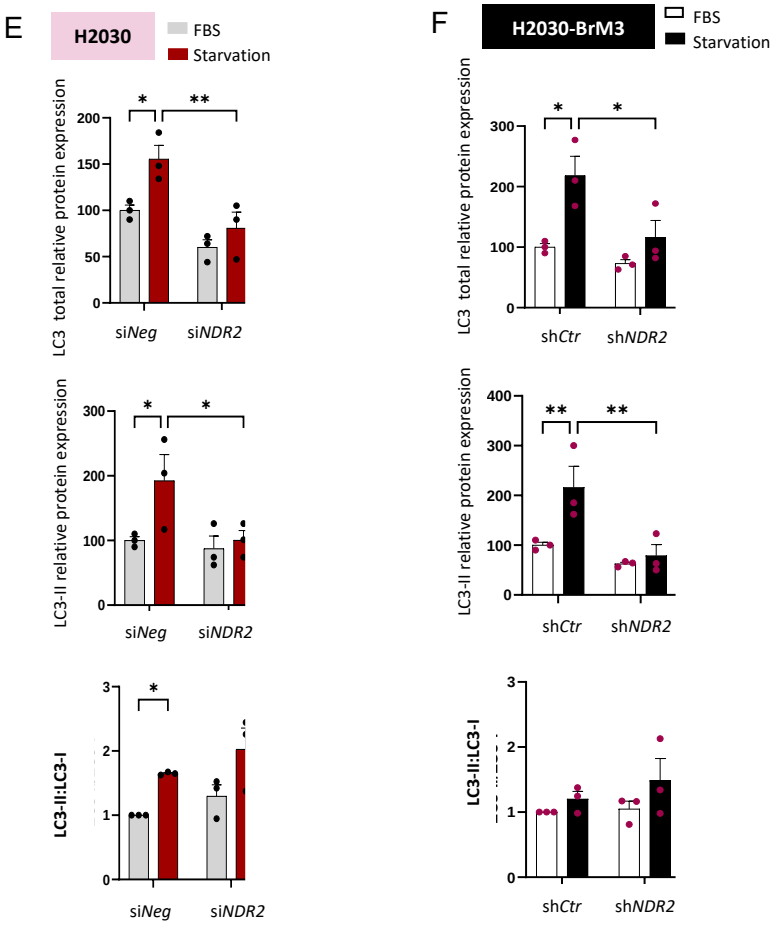

H2030
H2030-BrM3
H1299
FBS
Starvation
NDR1 mRNA expression
siNeg
siNDR2
shCtr
shNDR2
B
NDR2 mRNA expression
C
NDR1 relative protein expression
siNDR2
Starvation
NDR1
GAPDH
54 kDa
37 kDa
D
NDR2 relative protein expression
NDR2

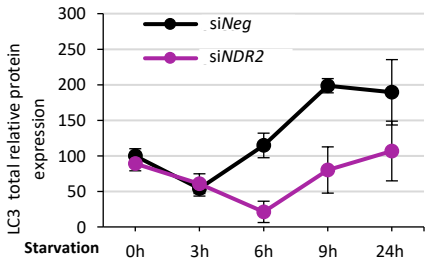
**Figure 1**

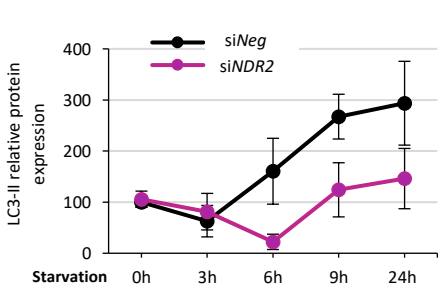

A
FBS
24 h Starvation
DMSO
CQ
DMSO
CQ
siNeg
siNDR2
20 µm
Cyto-ID/DAPI
B
siNeg DMSO
siNDR2 DMSO
siNeg CQ
siNDR2 CQ
Autophagosomes (Base 100)
FBS
24h Starvation


C
H2030
siNDR2
Starvation
16 kDa
62 kDa
54 kDa
37 kDa
LC3-I
LC3-II
SQSTM1/p62
NDR2
GAPDH
D
H2030-BrM3
shNDR2
Starvation


G
siNeg
siNDR2
LC3-I
LC3-II
GAPDH
Starvation 0h 3h 6h 9h 24h 0h 3h 6h 9h 24h


E
H2030
FBS
Starvation
LC3 total relative protein expression
LC3-II relative protein expression
LC3-II:LC3-I
siNeg
siNDR2
F
H2030-BrM3
shCtr
shNDR2


H
siNeg
siNDR2
LC3 total relative protein expression
Starvation
0h
3h
6h
9h
24h


I
siNeg
siNDR2
LC3-II relative protein expression
Starvation
0h
3h
6h
9h
24h

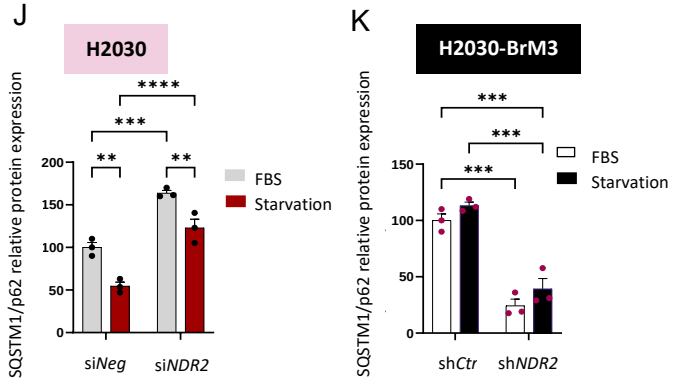

J
H2030
K
H2030-BrM3
SQSTM1/p62 relative protein expression
FBS
Starvation
siNeg
siNDR2
shCtr
shNDR2

**Figure 2**

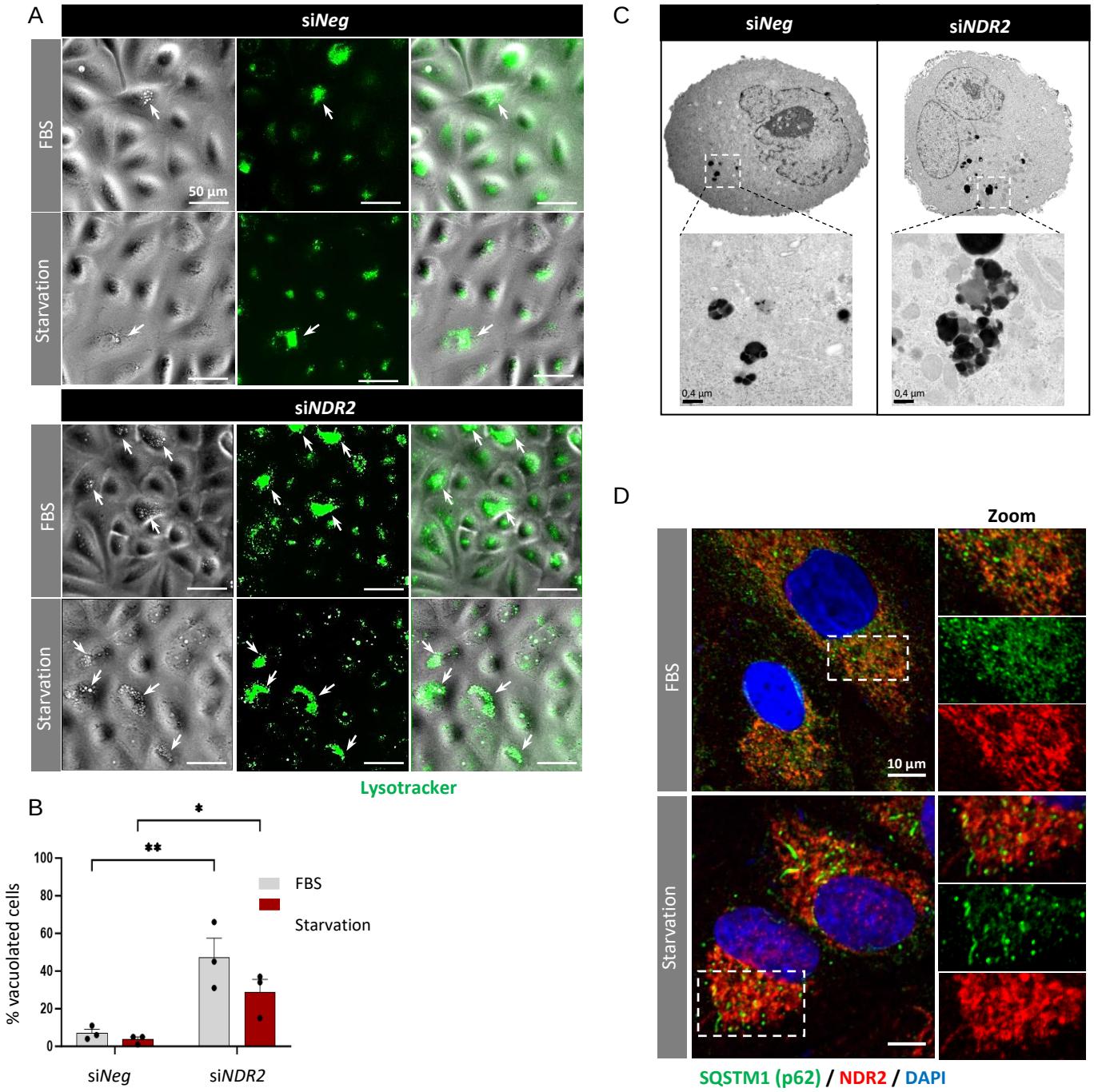

A
siNeg
siNDR2
FBS
Starvation
50 µm
Lysotracker
B
% vacuolated cells
100
80
60
40
20
0
*
**
FBS
Starvation
siNeg
siNDR2
C
siNeg
siNDR2
0,4 µm
0,4 µm
D
Zoom
FBS
Starvation
10 µm
SQSTM1 (p62) / NDR2 / DAPI

**Figure 3**

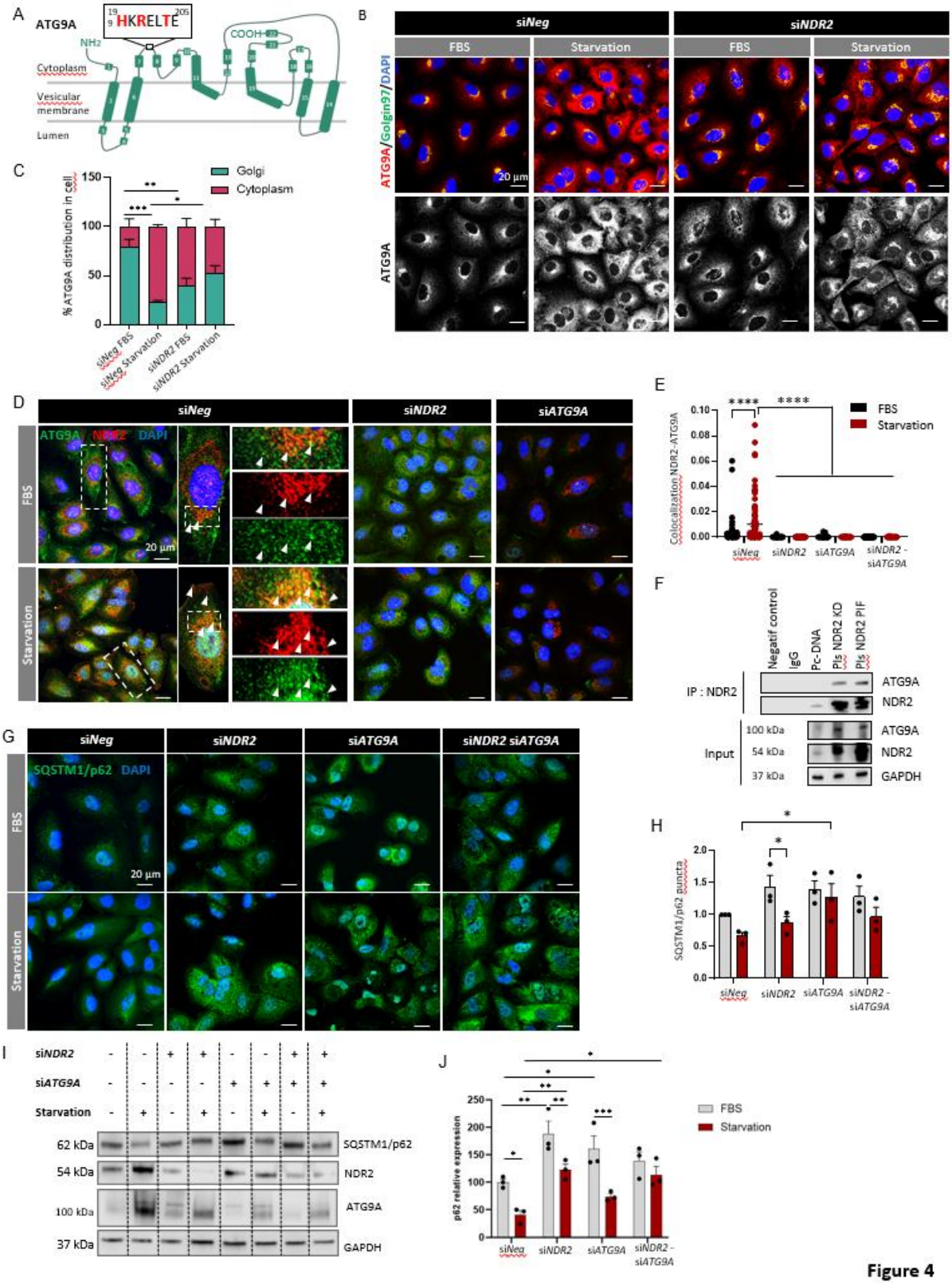
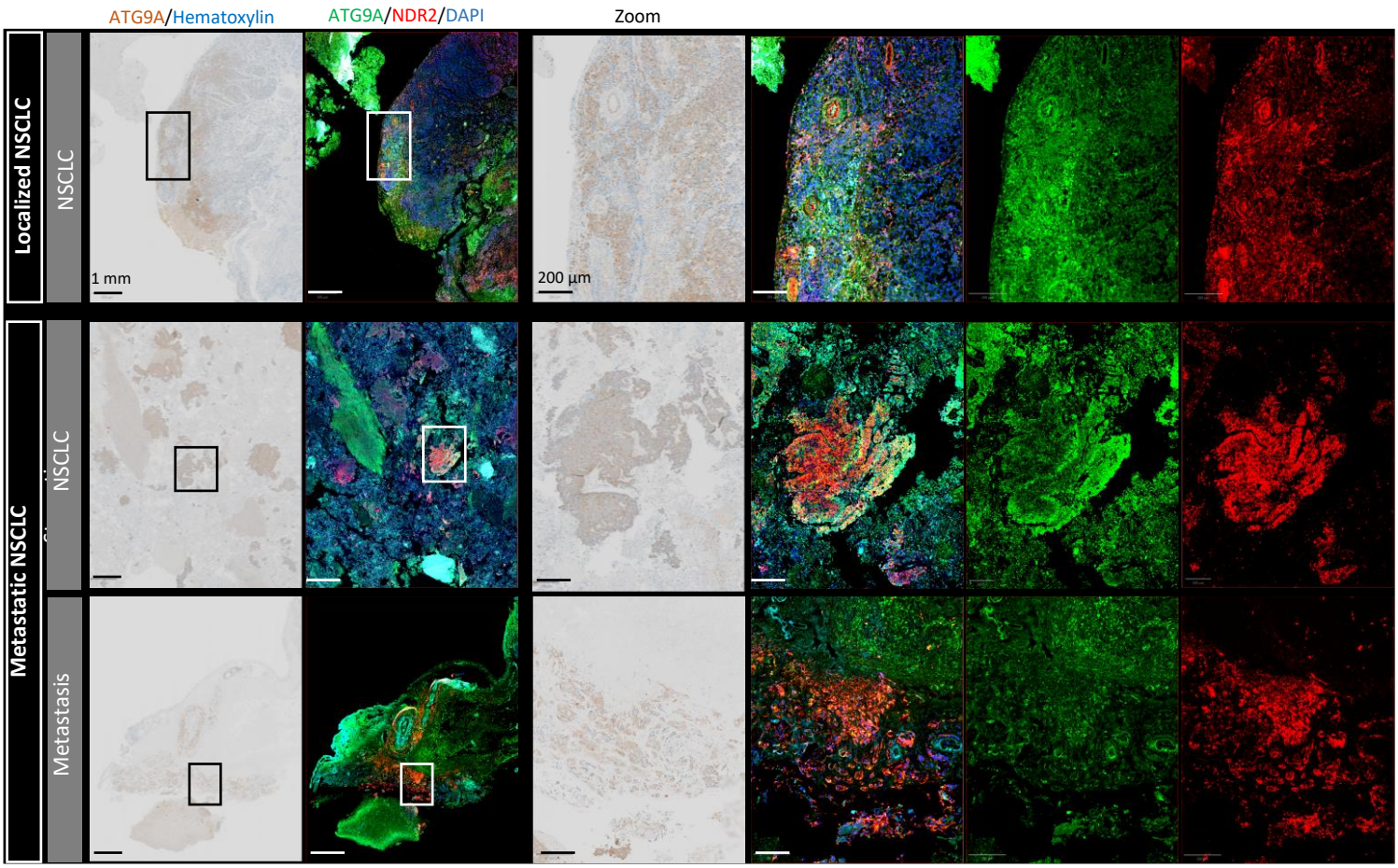

A
ATG9A
HKRELTE
NH2
COOH
Cytoplasm
Vesicular membrane
Lumen
B
siNeg
siNDR2
FBS
Starvation
ATG9A/Golgin97/DAPI
ATG9A
20 µm
C
Golgi
Cytoplasm
% ATG9A distribution in cell
siNeg FBS
siNeg Starvation
siNDR2 FBS
siNDR2 Starvation
D
siNeg
siNDR2
siATG9A
ATG9A NDR2 DAPI
FBS
Starvation
20 µm
E
FBS
Starvation
Colocalization NDR2-ATG9A
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 - siATG9A
F
Negatif control
IgG
Pc-DNA
Pls NDR2 KD
Pls NDR2 PIF
IP : NDR2
ATG9A
NDR2
Input
100 kDa
54 kDa
37 kDa
GAPDH
G
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 siATG9A
SQSTM1/p62 DAPI
FBS
Starvation
20 µm
H
SQSTM1/p62 puncta
I
siNDR2
siATG9A
Starvation
62 kDa
SQSTM1/p62
54 kDa
NDR2
100 kDa
ATG9A
37 kDa
GAPDH
J
p62 relative expression
FBS
Starvation

**Figure 4**

A


ATG9A/Hematoxylin
ATG9A/NDR2/DAPI
Zoom
Localized NSCLC
NSCLC
Metastatic NSCLC
NSCLC
Metastasis
1 mm
200 µm

B

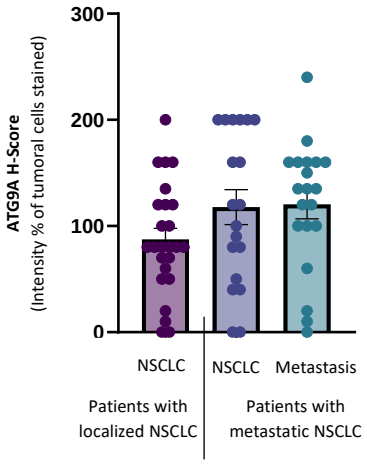

ATG9A H-Score
(Intensity % of tumoral cells stained)
300
200
100
0
NSCLC
NSCLC
Metastasis
Patients with localized NSCLC
Patients with metastatic NSCLC

**Figure 5**

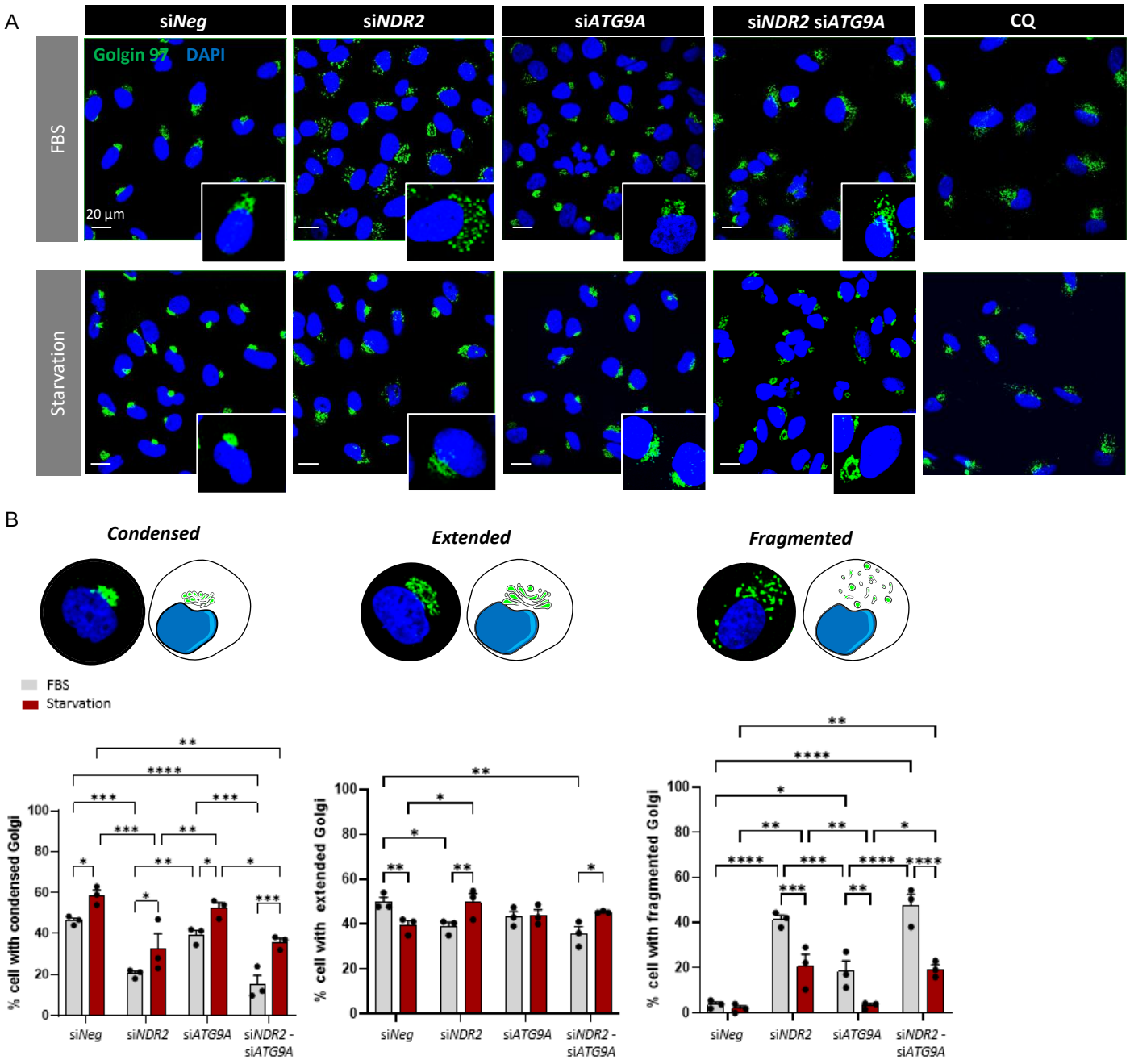

A
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 siATG9A
CQ
FBS
Starvation
Golgin 97
DAPI
20 µm
B
Condensed
Extended
Fragmented
FBS
Starvation
% cell with condensed Golgi
% cell with extended Golgi
% cell with fragmented Golgi
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 - siATG9A

**Figure 6**

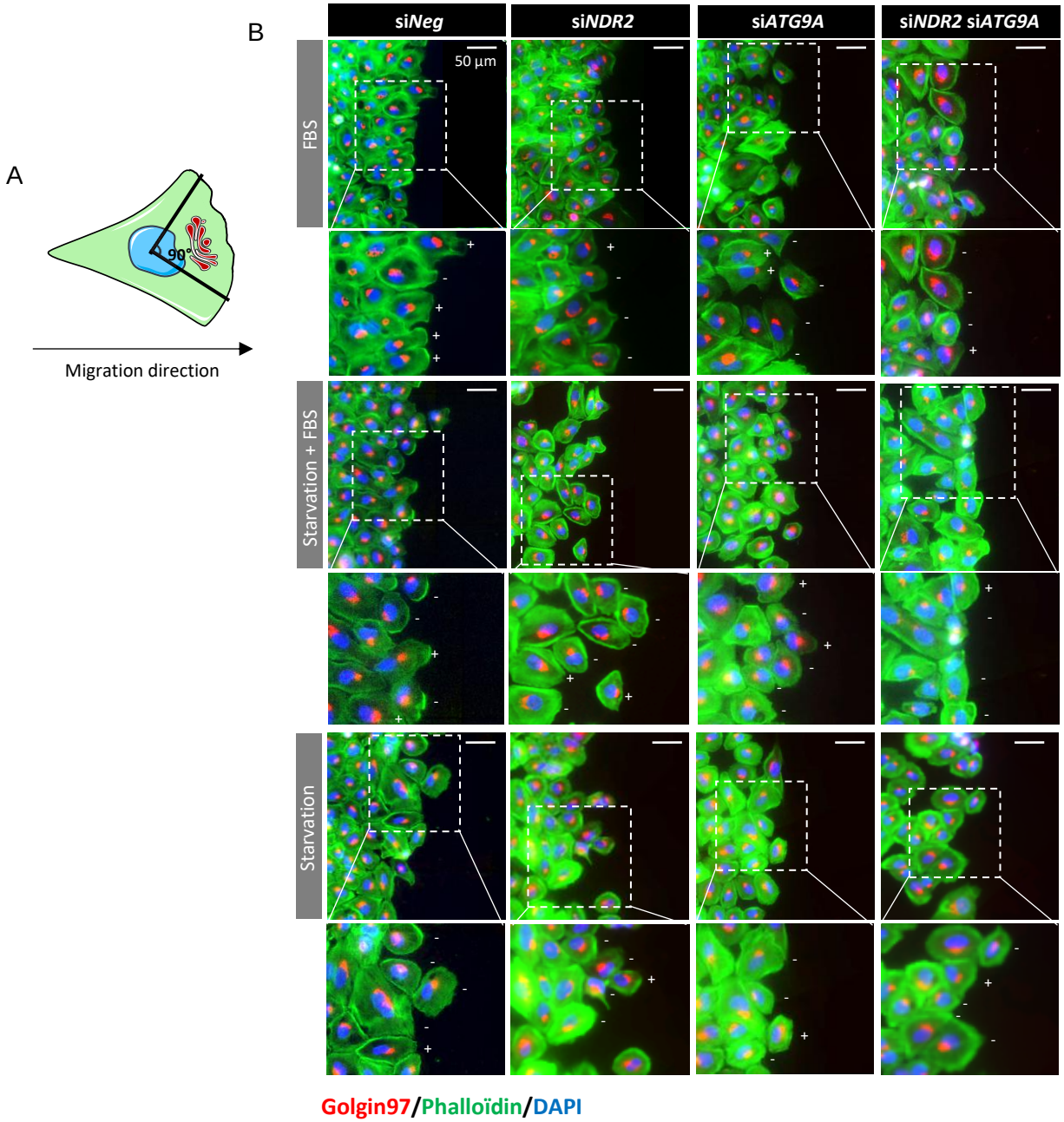

A
90°
Migration direction
B
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 siATG9A
50 µm
FBS
Starvation + FBS
Starvation
Golgin97/Phalloïdin/DAPI
C
% cell with oriented Golgi
100
80
60
40
20
0
FBS
Starvation + FBS
Starvation
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 -siATG9A



**Figure 7**

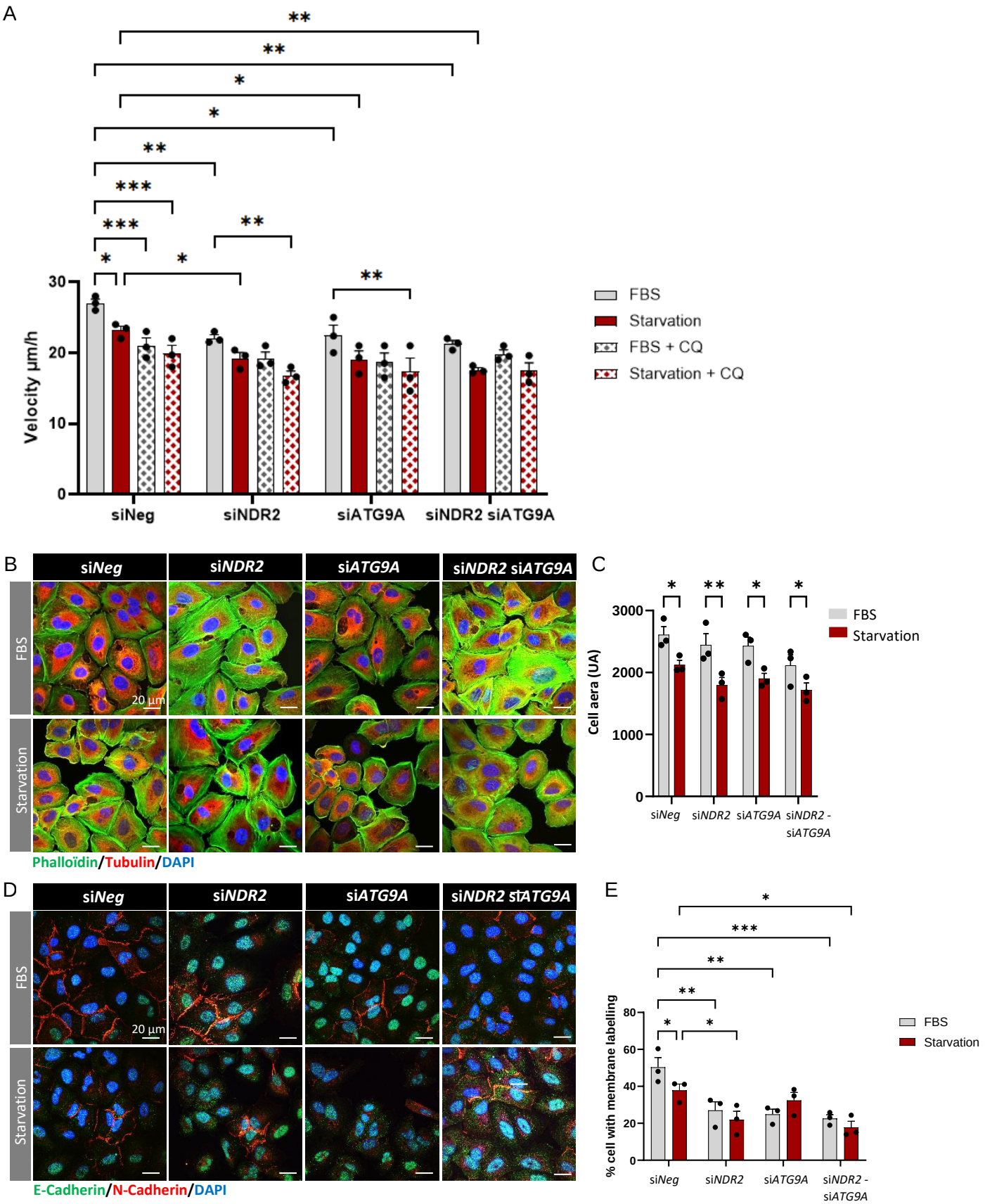
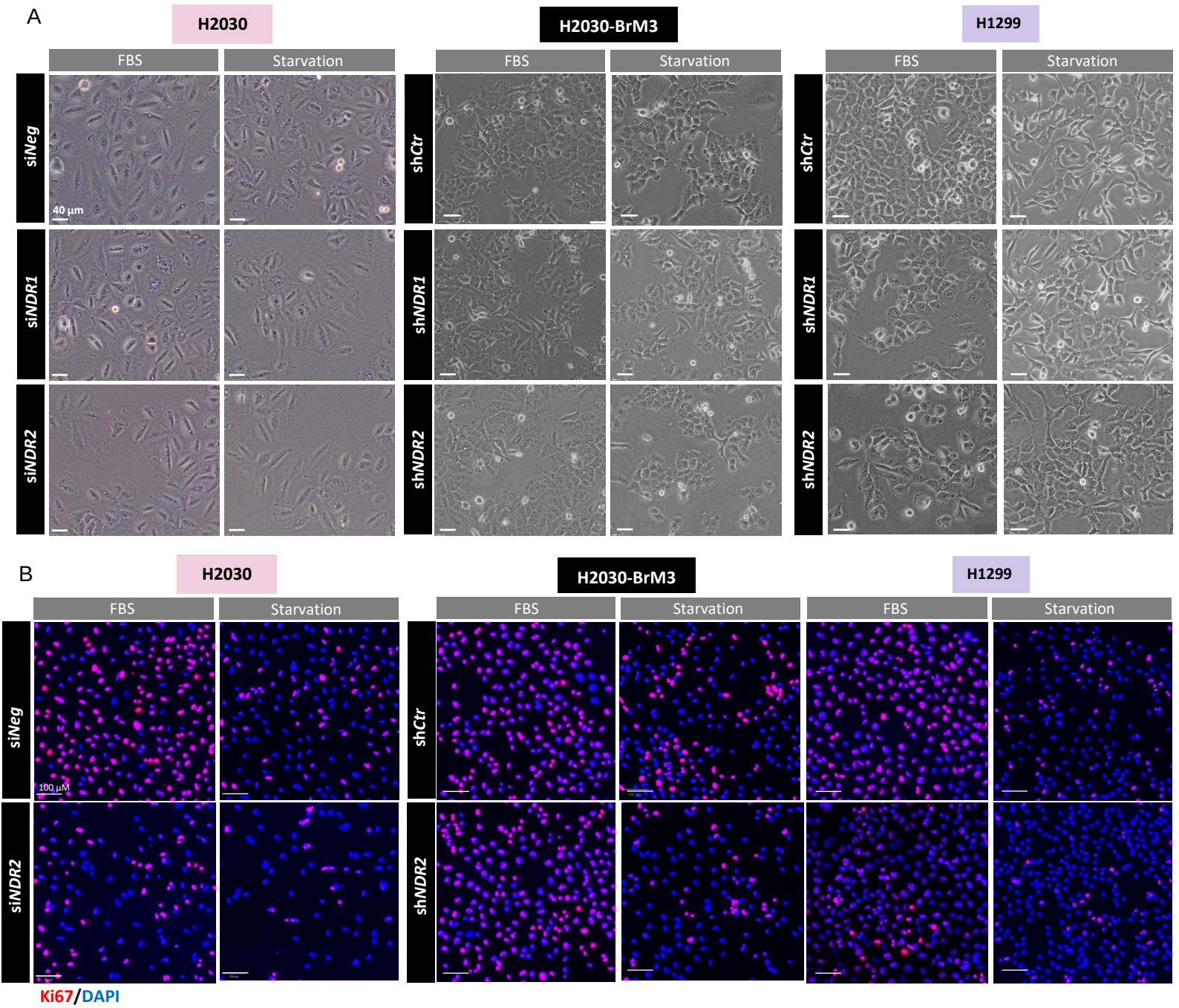

A
Velocity µm/h
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 siATG9A
FBS
Starvation
FBS + CQ
Starvation + CQ
B
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 siATG9A
FBS
Starvation
20 µm
Phalloïdin/Tubulin/DAPI
C
Cell aera (UA)
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 - siATG9A
FBS
Starvation
D
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 siATG9A
FBS
Starvation
20 µm
E-Cadherin/N-Cadherin/DAPI
E
% cell with membrane labelling
siNeg
siNDR2
siATG9A
siNDR2 - siATG9A
FBS
Starvation

**Figure 8**



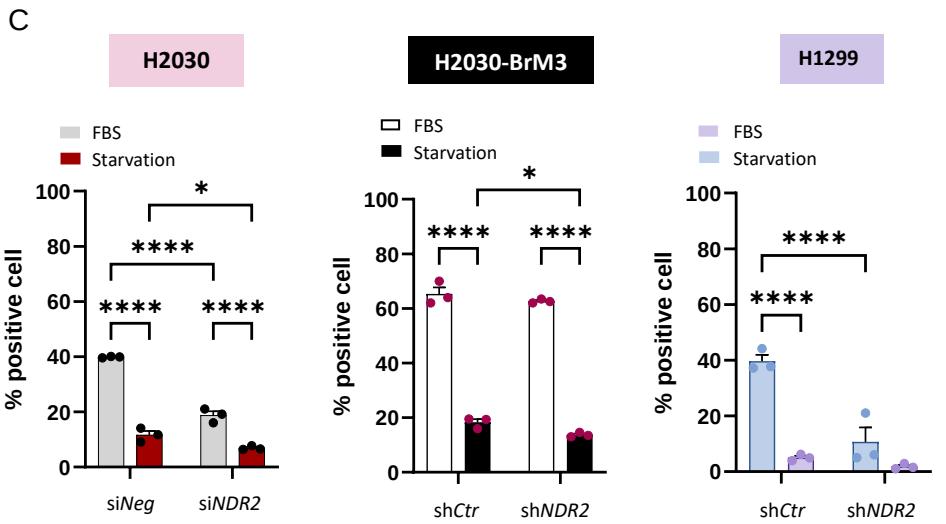




**Figure S1. The loss of NDR2 induced a decrease in proliferation under serum deprivation and normal conditions.** (**A**) Phase contrast images of the H2030, H2030-BrM3 and H1299 cell lines following serum deprivation and/or the depletion of NDR1 or NDR2. (**B**) Labeling of H2030 cells with the proliferation marker Ki67 and (**C**) quantification of Ki67 levels in H2030, H2030-BrM3 and H1299 cells. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

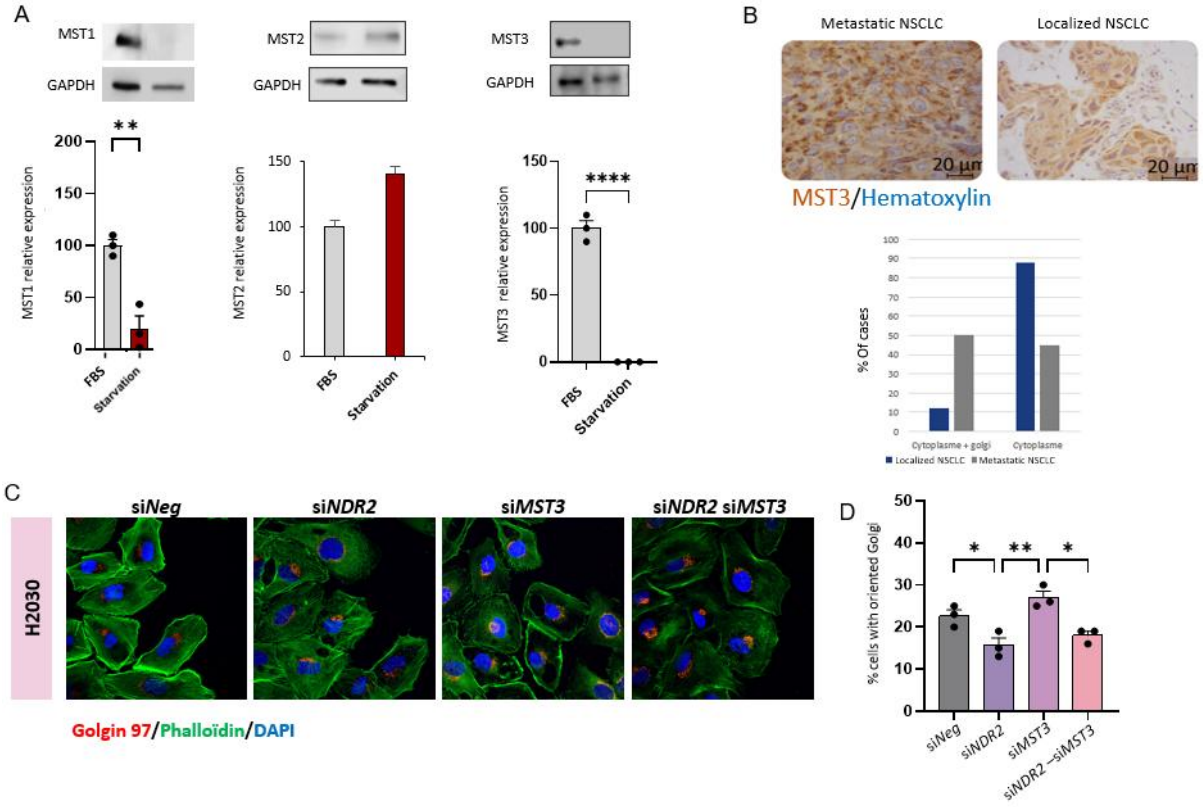



**Figure S2**. MST kinases are not involved in regulating NDR2 activity during serum deprivation.

(**A**) Western blots and quantification of MST1, MST2 and MST3 expression following 24 h of serum deprivation or normal cultivation. (**B**) MST3 labeling in metastatic or nonmetastatic NSCLC samples and quantification of MST3 expression in the Golgi or cytoplasm. (**C**) Image showing the position of the Golgi (red) during migration (t = 6 h) and (**D**) quantification of cells with the Golgi oriented toward the migration front during serum deprivation with or without the loss of NDR2 or MST3. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

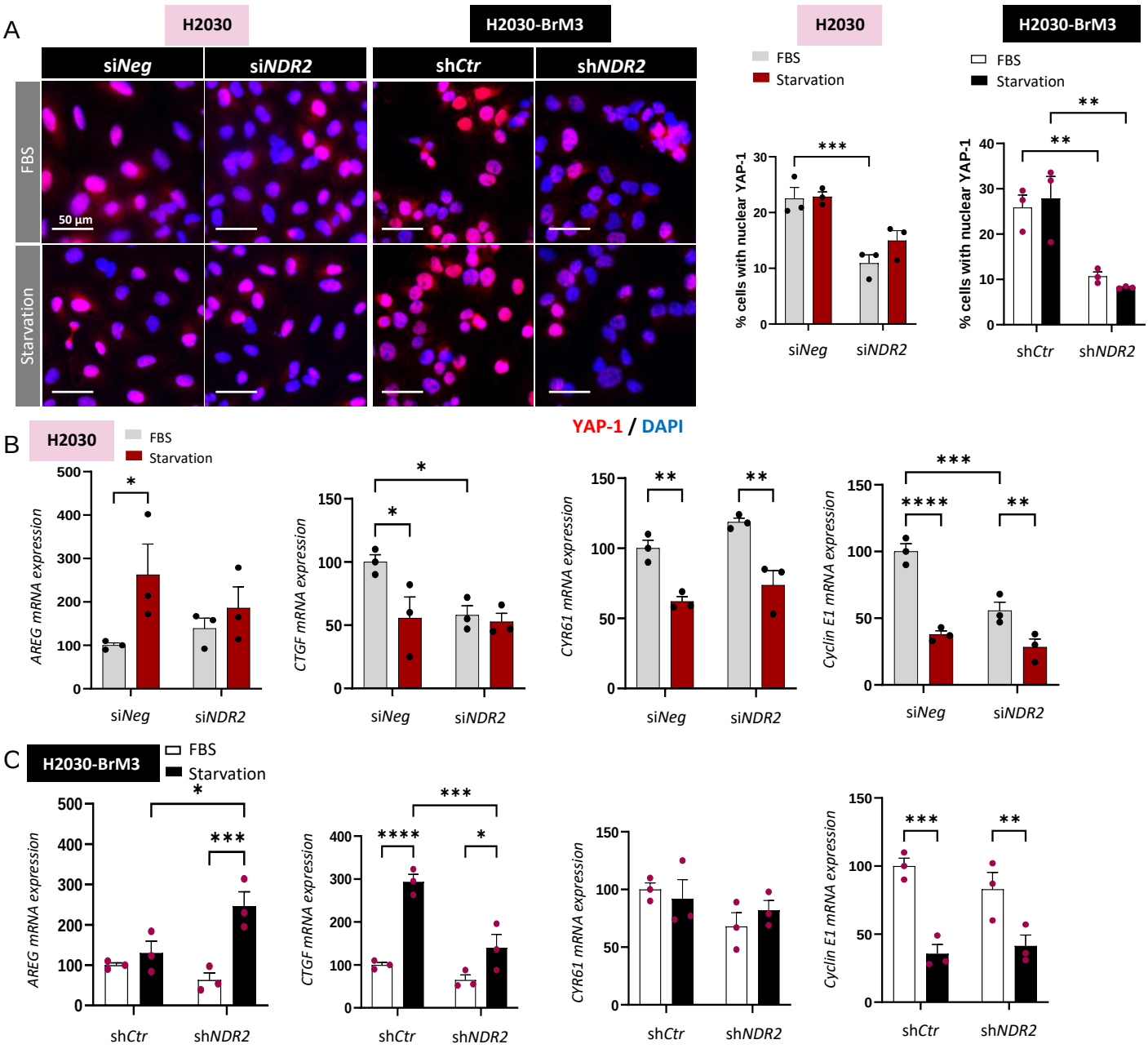



**Figure S3. The loss of NDR2 affected YAP-1 activity under starvation conditions.**

NDR2-silenced (si*NDR2* or sh*NDR2*) or control (si*Neg* or sh*Ctr*) or YAP-1-silenced (si*YAP-1*) H2030 and H2030-BrM3 cells were subjected to 24 h of FBS deprivation or normal culture. (**A**) YAP-1 labeling and quantification of nuclear labeling. (**B-C**) Expression of various YAP-1 target genes in H2030 cells (**B**) and H2030-BrM3 cells (**C**). LC3 mRNA expression in H2030 cells (**D**) and H2030-BrM3 cells (**E**). Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3, *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.

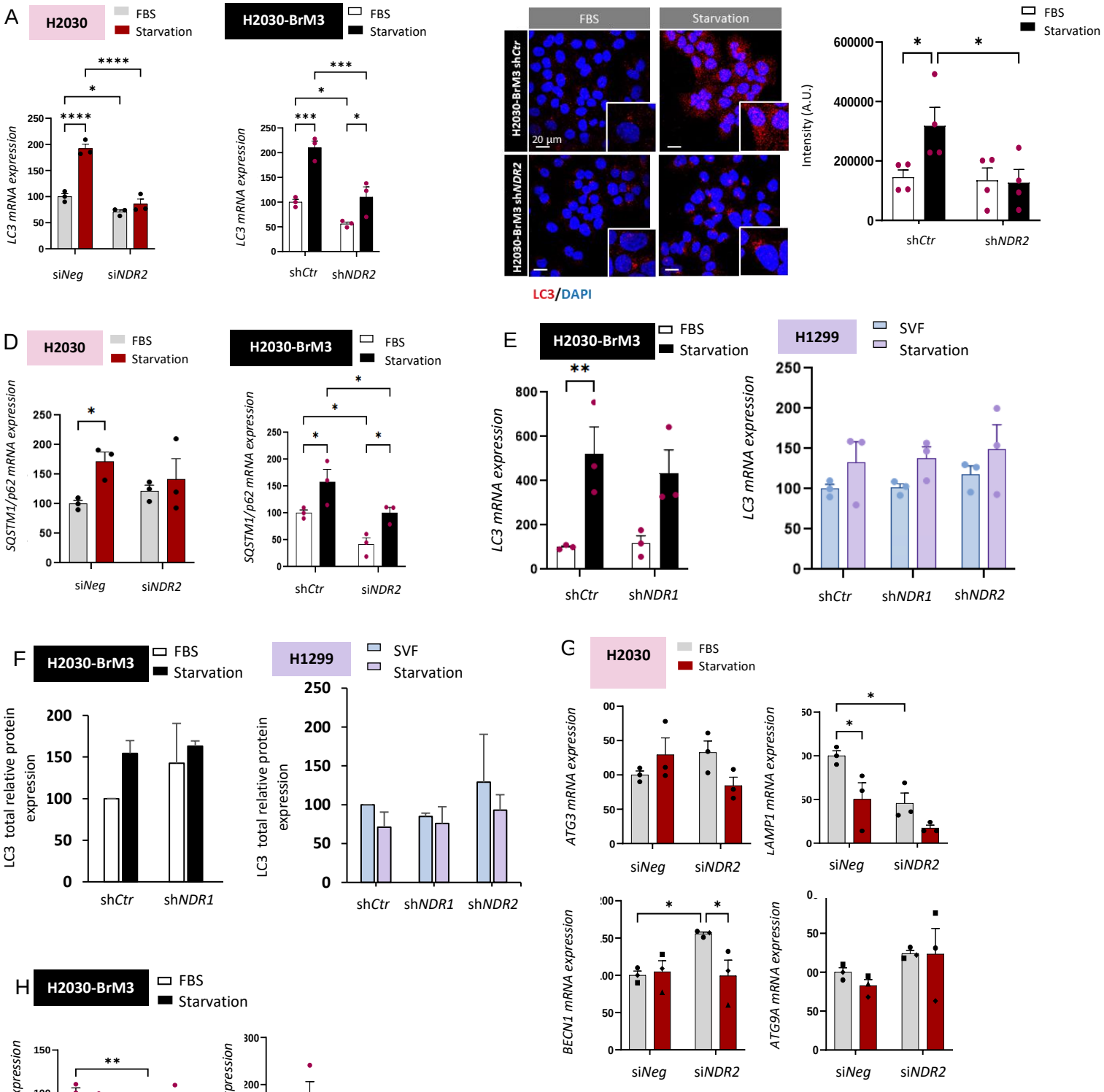



**Figure S4. NDR2 had no impact on TFEB activity.**

(**A**) Quantification of *LC3* mRNA expression in H2030 and H2030-BrM3 lines expressing or lacking NDR2 following 24 h of serum deprivation. (**B**) Image of LC3 immunofluorescence labeling of H2030-BrM3 cells in which NDR2 was or was not depleted with an shRNA under serum starvation or complete serum conditions and quantification of the results (**C**). (**D**) Quantification of *SQSTM1/p62* mRNA expression in H2030 and H2030-BrM3 cells. (**E**) *LC3* mRNA expression in H2030-BrM3 and H1299 cells cultured with or without FBS (starvation) and depleted of NDR2 or NDR1. (**F**) LC3 protein expression in H2030-BrM3 and H1299 cells cultured with or without FBS and depleted of NDR2 or NDR1. (**G-H**) Expression of different TFEB target genes in H2030 (**G**) and H2030-BrM3 cells (**H**). Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3 *p<0.05 and **p<0.01

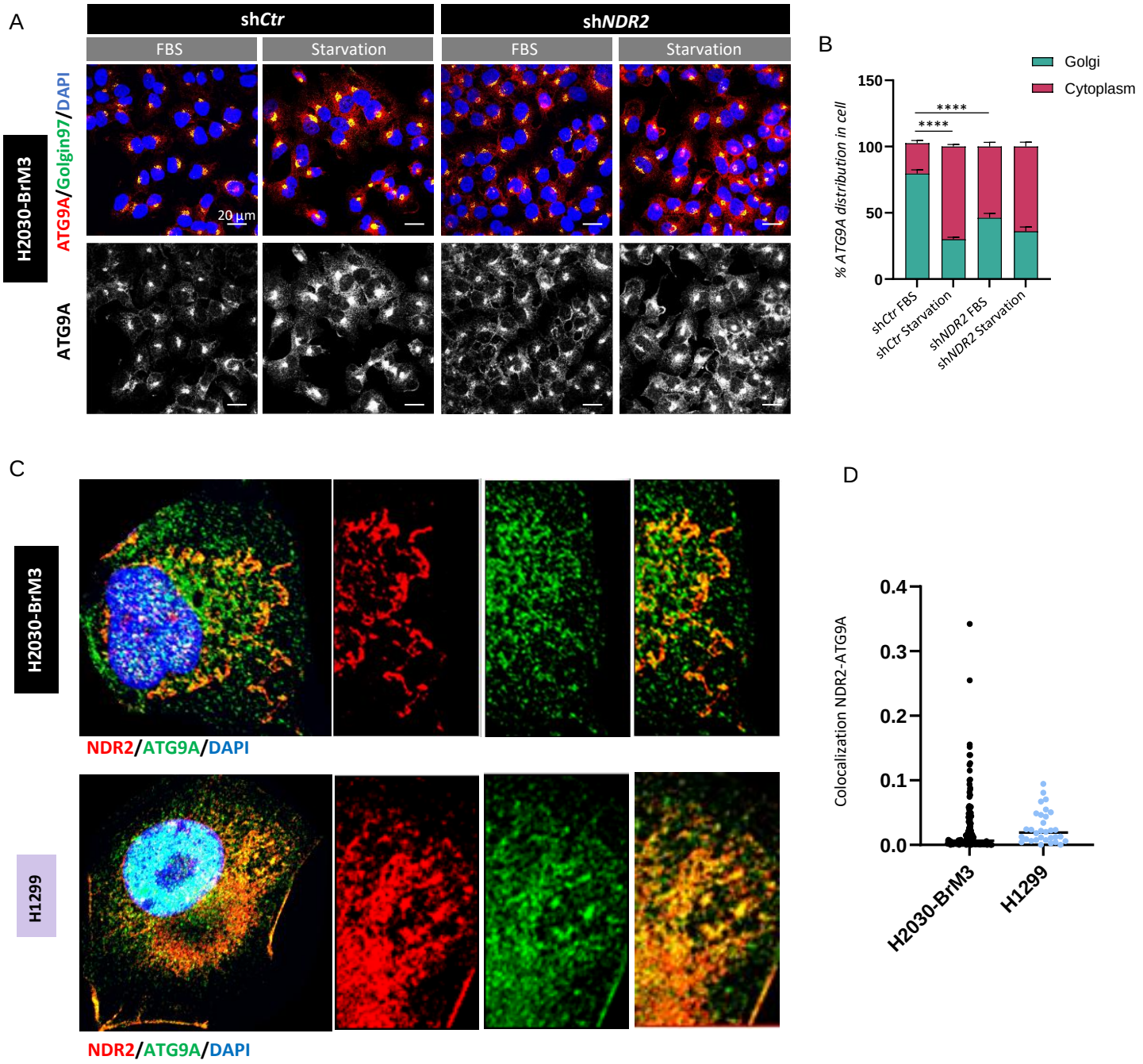



**Figure S5. NDR2 interacted with ATG9A for transport into H2030-BrM3 and H1299 cells.** Immunolabelling (A) and quantification of ATG9A localization (B) following 24 h or culture with or without FBS along with NDR2 silencing in H2030 cells. (C) Colocalization of NDR2 and ATG9A immunolabeling in H2030 cells under normal or serum-deprived conditions and after the transfection of si*NDR2* or si*ATG9A*. (D) Quantification of NDR2-ATG9A colocalization.

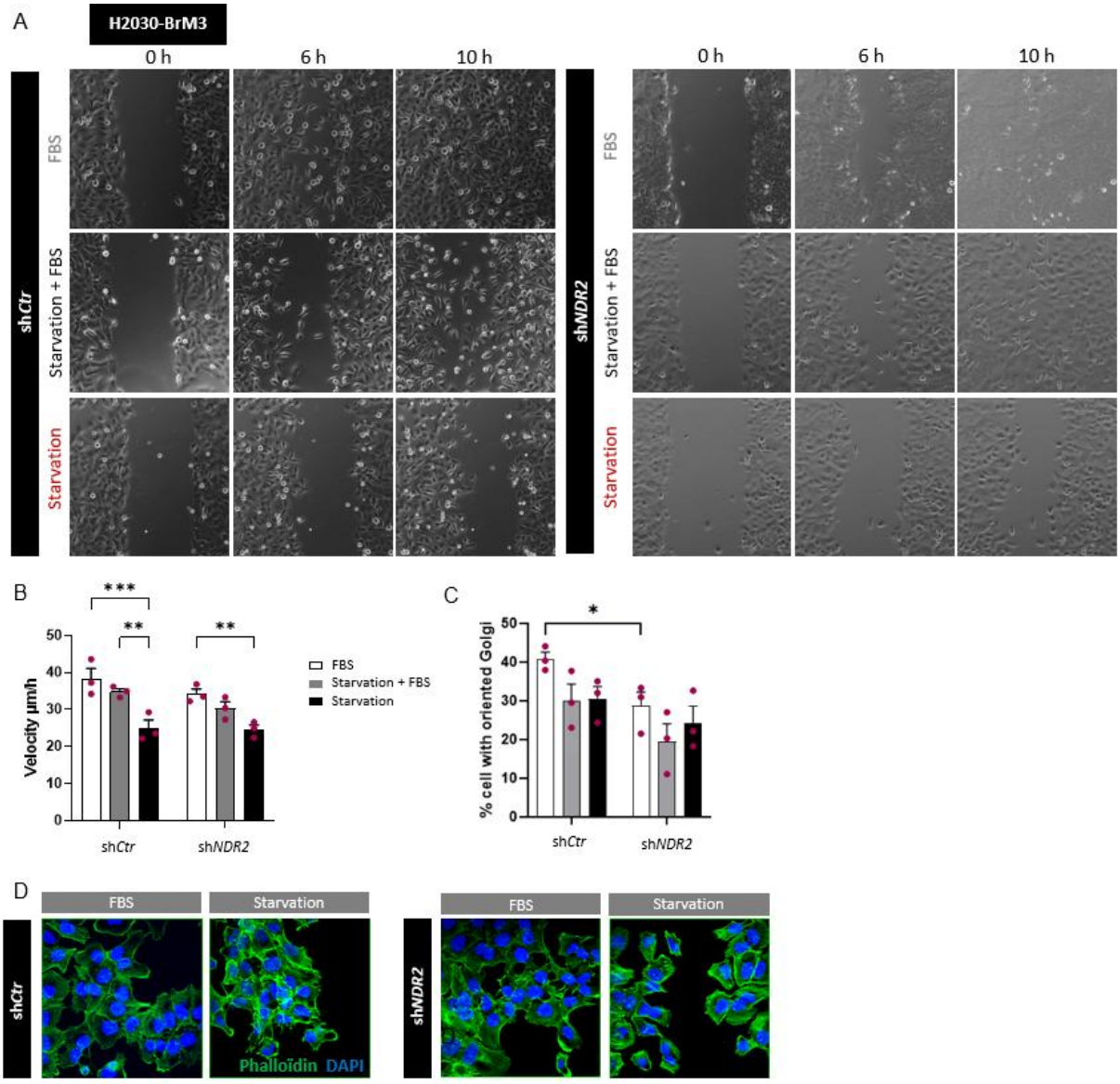



**Figure S6.** NDR2 is required for H2030-BrM3 cell migration under serum starvation conditions.

(**A**) Inverted phase microscopy images (x20) and (**B**) quantification of the results of the wound-healing assay with H2030-BrM3 cells with or without NDR2 silencing in complete media or starvation media at 0 h, 6 h and 10 h after scraping. (**C**) Quantification of the number of cells with or without NDR2 silencing in which the Golgi was oriented toward the migration front during serum deprivation. (**D**) Immunolabeling for phalloidin (green). Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to analyze the data, means ± SEMs, N=3, *p<0.05 and **p<0.01.

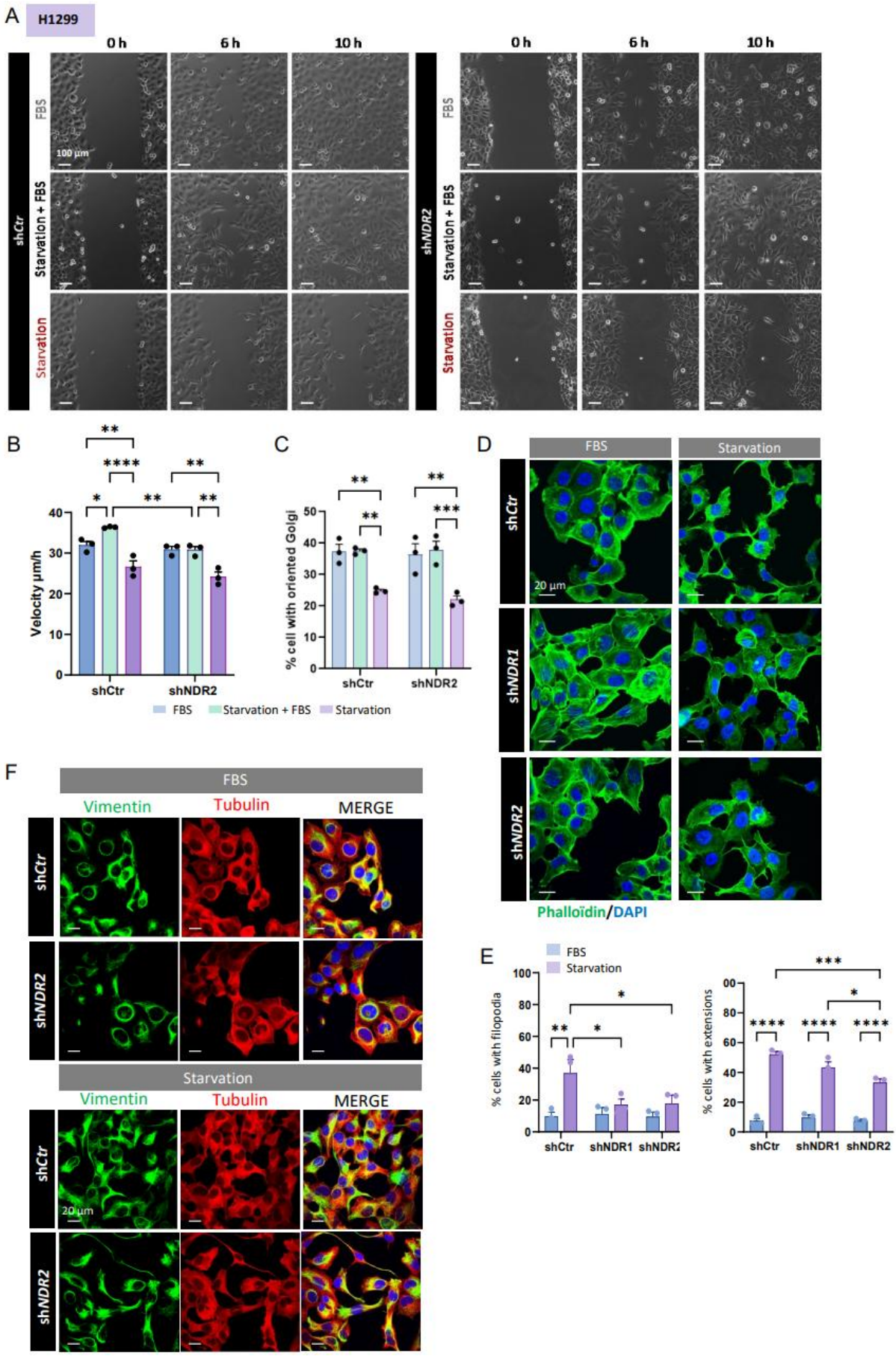

A
H1299
0 h
6 h
10 h
shCtr
shNDR2
FBS
Starvation + FBS
Starvation
100 µm
B
Velocity µm/h
shCtr
shNDR2
C
% cell with oriented Golgi
D
FBS
Starvation
shCtr
shNDR1
shNDR2
20 µm
Phalloïdin/DAPI
E
% cells with filopodia
% cells with extensions
F
Vimentin
Tubulin
MERGE
20 µm

**Figure S7**. NDR2 is required for H1299 cell migration and regulates the cytoskeleton under serum starvation conditions.

(**A**) Inverted phase contrast microscopy (x20) images and (**B**) quantification of the wound-healing assay with H1299 cells with or without NDR2 and/or ATG9A silencing cultured in complete media or starvation media at 0 h, 6 h and 10 h after scraping. (**C**) Quantification of the number of cells with NDR2 silencing in which the Golgi was oriented toward the migration front during serum deprivation. (**D**) Immunolabeling for phalloidin (green) and quantification of cell expansion and filopodia (**E**). (**F**) Immunolabeling for vimentin (green) and tubulin (red). Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to determine the means ± SEMs, N=3. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

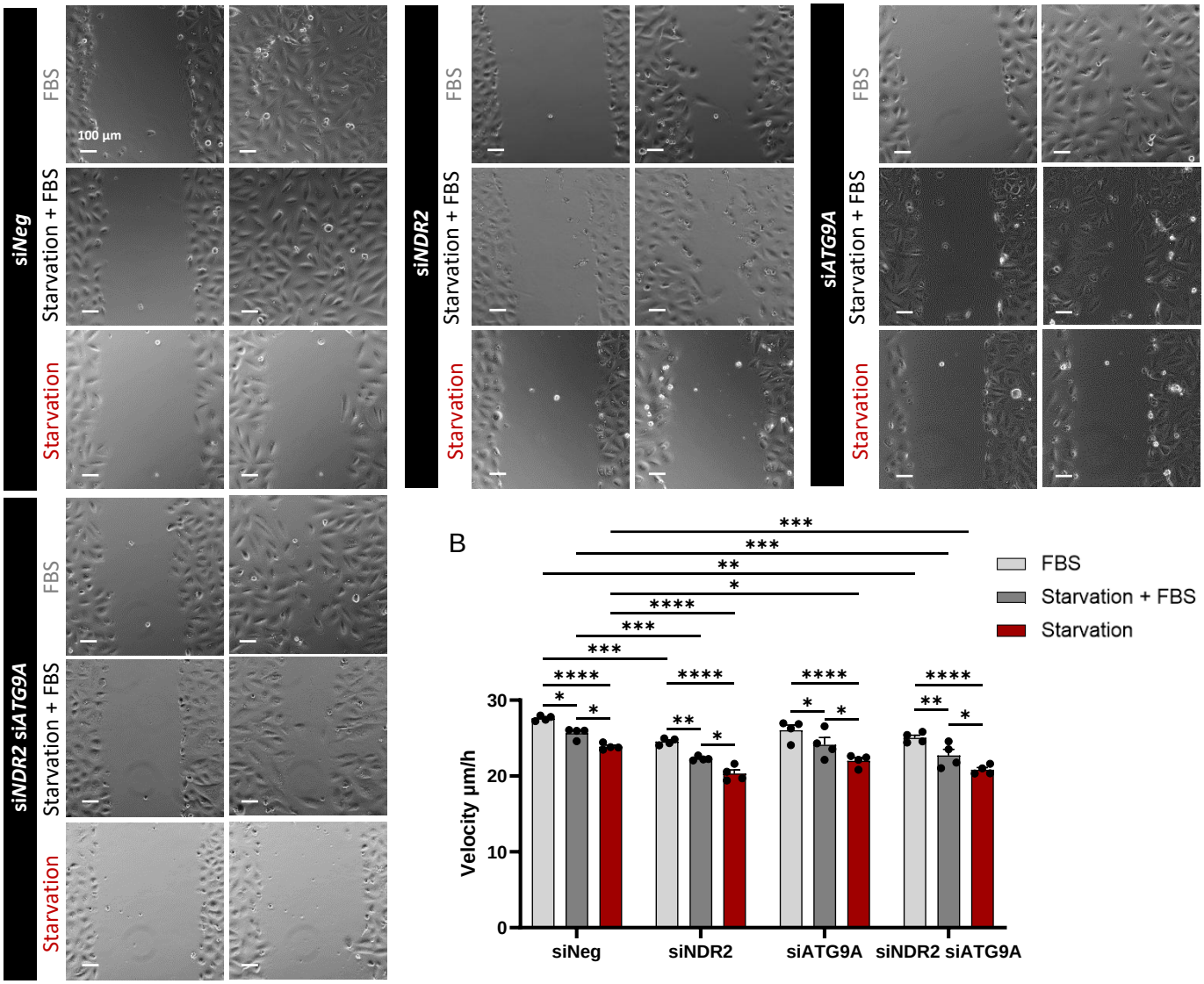



**Figure S8. NDR2 and ATG9A are required for H1299 cell migration**

(**A**) Inverted phase microscopy images (x20) and (**B**) quantification of the wound-healing assay with H2030 cells with or without NDR2 and/or ATG9A silencing in full media or starvation media and with or without CQ at 0 h, 10 h and 20 h after scraping. Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test were used to determine the means ± SEMs, N=4. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 and ****p<0.0001.

**Table S1.** siRNA and plasmids used in this work.

| Target | siRNA (5' → 3') |
|---|---|
| **NDR1** | **si1:** AAGUAAUAGGCAGAGGAGCAU(TT)<br>**si2:** AAGAGCAGGUUGGCCACAUUC(TT) |
| **NDR2** | **si1:** AAGUUACGUCGAUCACAACAC(TT)<br>**si2:** AAGACACCUUGACAGAAGAGG (TT) |
| **ATG9A** | **si1:**UUCUGCGUCUGCACGAUCC(TT)<br>**si2:** UUUCGGAAGAAGUCUAUA(TT) |
| **MST3** | **si1:** GGCAUUGACAAUCGGACUC(TT)<br>**si2:** GGAGAAGAGCCAGGCGUGC(TT) |
| **YAP-1** | **si1**: AGGUACUUCCUCAAUCACA (TT)<br>**si2**: CUAGGAAGGCGAUGAAUCA (TT) |

**Table S2.** Primers used for PCR and qRT-PCR in this work.

| Target | Primers (5' → 3 ') |
|---|---|
| **ATG3** | **F:** ACT-GAT-GCT-GGC-GGT-GAA-GAT-G<br>**R:** GTG-CTC-AAC-TGT-TAA-AGG-CTG-CC |
| **ATG9A** | **F:** GAGCCTGCATGCCCTCTATA<br>**R:** CAGAGCGAGGGATAGACTGG |
| **Beclin-1** | **F:** GGCTGAGAGACTGGATCAGG<br>**R:** CTGCGTCTGGGCATAACG |
| **LAMP1** | **F:** CGT-GTC-ACG-AAG-GCG-TTT-TCA-G<br>**R:** CTG-TTC-TCG-TCC-AGC-AGA-CAC-T |
| **LC3B** | **F:** GAGAAGCAGCTTCCTGTTCTGG<br>**R:** GTGTCCGTTCACCAACAGGAAC |
| **NDR1** | **F:** CTGGAGCCAGTTCTGCTTCT<br>**R:** GTCACGCTCCGCACGAAT |
| **NDR2** | **F:** CTTGGCTTGGATGACTTTGAG<br>**R:** AGGCACCATCTGCTTCTACC |
| **SQSTM1/p62** | **F**: GTG-CTC-AAC-TGT-TAA-AGG-CTG-CC<br>**R**: AGT-GTC-CGT-GTT-TCA-CCT-TCC-G |
| **S16** | **F:** CTG GAG CCA GTT CTG CTT CT<br>**R:** TCT GGT AAT AGG CCA CCA GG |

**Table S3.** Antibodies used in this work.

| Target, clone | Host | Clonality | Supplier, product number |
|---|---|---|---|
| **ATG9A** | Rabbit | Monoclonal | Abcam, Ab-108338 |
| **E-Cadherin (24E10)** | Rabbit | Monoclonal | Cell Signaling Technology, 3195S |
| **Golgin-97** | Mouse | | Santa Cruz Biotechnology, SC-73619 |
| **GAPDH** | Rabbit | Monoclonal | Cell Signaling Technology, 2118S |
| **Ki67 (8D5)** | Mouse | Monoclonal | Cell Signaling Technology, 9449S |
| **LC3B** | Rabbit | Monoclonal | Cell Signaling Technology, 3868S |
| **MST3** | Rabbit | Polyclonal | Cell Signaling Technology, 3723S |
| **N-Cadherin** | Mouse | Monoclonal | Ebioscience, 14-3259-82 |
| **NDR1 (YJ-7)** | Mouse | Monoclonal | Santa Cruz Biotechnology FO316, sc-100404 |
| **NDR2 (STK38L)** | Mouse | Monoclonal | Lifespan Biosciences, LS-C174201-100 |
| **Phalloidin** | | | Invitrogen, Thermofisher scientific, A12379 |
| **SQSTM1/p62** | Rabbit | Polyclonal | Sigma Aldrich, P0067 |
| **Tubulin** | Mouse | Monoclonal | Sigma Aldrich, 038M4837V |
| **SQSTM1/p62** | Rabbit | | Sigma Aldrich, P0067 |
| **Vimentin** | Rabbit | Monoclonal | Cell Signaling Technology, 5741S |
| **YAP(D8H1X)** | Rabbit | Monoclonal | Cell Signaling Technology, 14074S |
| **Anti-Mouse IgG HRP linked antibody** | Goat | | Cell Signaling Technology, 7076S |
| **Anti-Rabbit IgG HRP linked antibody** | Goat | | Cell Signaling Technology, 7074S |

# DISCUSSION GENERALE

L'objectif principal de cette thèse était d'approfondir notre compréhension de fonctions oncogéniques de la kinase NDR2 et d'identifier de nouveaux partenaires de NDR2 (directs ou indirects) susceptibles d'expliquer les propriétés invasives et métastatiques acquises par les cellules tumorales bronchiques ayant une suractivation de cette kinase. Dans cette optique, nous avons exploré deux conditions physiopathologiques fréquemment rencontrées dans les tumeurs solides (Horsman & Vaupel, 2016) : l'hypoxie et la privation en nutriments.

**NDR2 est active en condition hypoxique dans les cellules tumorales bronchiques**

Nous avons pu constater qu'une hypoxie sévère (48h, à 0,2% d'O2) altère l'expression de différents membres de la voie Hippo dont RASSF1A dans différentes lignées tumorales bronchiques. Ce résultat fut surprenant puisqu'auparavant Dabral et al, avaient montré une relation positive entre RASSF1A et HIF-1α facilitant la réponse au stress hypoxique dans les cellules tumorales bronchiques (Dabral et al., 2019). Toutefois, ces données ont été obtenues dans un contexte d'une hypoxie de courte durée. Les mécanismes mis en place pour les hypoxies de courtes et de longue durée peuvent différer(Salem et al., 2018) pouvant expliquer cette différence de résultats. De plus, les modèles cellulaires sont également différents. Même si les travaux ont été réalisé sur des cellules tumorales bronchiques dans les deux cas, Dabral et al, ont utilisé des cellules tumorales bronchiques primaires alors que nous avons travaillé sur des lignées cellulaires immortalisées. Cette différence phénotypique et les fonds génétiques différents peuvent également expliquer l'opposition de nos résultats. De plus, RASSF1A n'est pas la seule protéine de la voie Hippo dont l'expression est atténuée lors d'une hypoxie puisque pour toutes les kinases du cœur de la voie, une diminution de leur expression est observée, hormis pour NDR2. A l'inverse, nous avons constaté une activation de YAP-1 (et non de TAZ), montrant une régulation différente en hypoxie de ces deux effecteurs, phénomène déjà rapporté dans d'autres types de cancers (H. Wei et al., 2017; Greenhough et al., 2018; X. Zhang, Li, et al., 2018). Ces données montrent que malgré la redondance de certains rôles entre les kinases NDR (LATS1/2 et NDR1/2) et entre YAP-1 et TAZ, ces protéines ont aussi des rôles spécifiques notamment dans la réponse à l'hypoxie dans le contexte du CBNPC.

**NDR2 contribue à la résistance à une hypoxie sévère des cellules tumorales bronchiques par divers mécanismes interconnectés et dépendants de YAP-1, HIF-1α et c-Jun**

- ***NDR2 exerce son action oncogénique en condition hypoxique via YAP-1, HIF-1α et c-Jun***

Ici, nous avons montré, qu'en absence de RASSF1A et en réponse à une hypoxie sévère, la kinase NDR2 activait directement ou indirectement YAP-1 (les mécanismes sous-jacents ne sont pas identifiés, ils pourraient impliquer les protéines Rho comme en condition normoxique (Keller et al., 2019)), HIF-1α et c-Jun. YAP-1 et c-Jun ont déjà été décrits comme pouvant interagir fonctionnellement avec HIF-1α. En effet, HIF-1α renforce l'activité de YAP-1, notamment par la formation d'un hétérodimère favorisant leur translocation nucléaire et l'induction de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse et la survie cellulaire(X. Zhang, Li, et al., 2018; Bora-Singhal et al., 2022; Y. Zhao et al., 2023). Cette interaction directe aurait également un effet cytoprotecteur contre les dommages à l'ADN induits par l'hypoxie, prévenant ainsi l'apoptose(H.-A. Chang et al., 2023). Par ailleurs, l'activation de YAP-1 en réponse à l'hypoxie a été impliquée dans l'induction de la TEM, notamment dans le cancer pancréatique (H. Wei et al., 2017). La voie HIF peut également activer YAP-1 par des mécanismes indépendants de la voie Hippo, notamment *via* l'activation de RCPG, qui activent les GTPases Rho, modifiant le cytosquelette et induisant la translocation nucléaire de YAP-1 (H. W. Park et al., 2015; Greenhough et al., 2018).

Toutefois, dans notre modèle, la relation entre YAP-1 et HIF-1α ne semble pas réciproque : l'hypoxie favorise YAP-1 mais l'inhibition de YAP-1 conduit à une accumulation de HIF-1α nucléaire et une surexpression de ses gènes cibles, suggérant que YAP-1 ne régule pas positivement HIF-1α dans les cellules de CBNPC en hypoxie sévère et prolongée (Levallet et al., 2023). Il serait néanmoins intéressant d'examiner une éventuelle interaction fonctionnelle entre YAP-1 et HIF-2α, comme cela a été rapporté dans le cancer colorectal, où HIF-2α favorise l'activation de YAP-1 (X. Ma et al., 2017), ou encore HIF-3a, une isoforme pour laquelle très peu de données sont disponibles.

Dans le cancer du sein, l'hypoxie induit l'expression de la ligase E3 ubiquitine SIAH2, qui réprime l'expression de LATS2, entraînant ainsi une activation accrue de YAP-1 (B. Ma et al., 2015). De manière concordante, nous avons observé dans nos lignées de cellules tumorales

bronchiques qu'une perte de SIAH2 conduit à une diminution de l'expression des gènes cibles de YAP-1 (données non montrées), suggérant un mécanisme de régulation similaire.

De façon analogue à l'interaction SIAH2-LATS2, une interaction entre NDR2 et SIAH2 peut être envisageable. Toutefois, celle-ci n'induirait pas la dégradation de NDR2 mais son activation. En effet, *in vitro*, la déplétion de SIAH2 n'augmente pas l'expression de NDR2 et nous ne retrouvons aucun effet additif lors de déplétion de ces deux protéines sur l'activité de YAP-1 (données non montrées). Ces résultats suggèrent une potentielle relation entre SIAH2 et NRD2 conduisant à l'activation de YAP-1 dans les cellules de CBNPC. Cette hypothèse est soutenue par une étude ayant mis en avant que NDR2 pouvait être ubiquitinylée sans être dégradée ; NDR2 ubiquitinylée sert alors de protéine d'échafaudage(Y. Yang et al., 2022). NDR2 pourrait aussi permettre le rapprochement de SIAH2 avec une autre protéine rendant compte de l'action de YAP-1 en condition hypoxique.

Enfin, bien qu'aucune étude antérieure n'ait démontré une régulation de HIF-1α par la kinase NDR2, nous avons observé que sa déplétion induit une diminution de la localisation nucléaire de HIF-1α ainsi que de l'activation transcriptionnelle de ses gènes cibles. Ces résultats suggèrent que NDR2 pourrait jouer un rôle dans l'adaptation des cellules tumorales bronchiques à l'hypoxie *via* des mécanismes indépendants de la voie Hippo et de YAP-1.

Outre YAP-1, NDR2 contrôle également l'activité de c-Jun ce qui pourrait être à l'origine de l'activation de HIF-1α. Plusieurs études ont montré que c-Jun peut interagir et stabiliser HIF-1α, favorisant l'expression d'un panel de gènes impliqués dans la survie, l'angiogenèse (Alfranca et al., 2002; B. Yu et al., 2009; S. Meng et al., 2018b). Dans notre modèle, où l'activation de NDR2 est associée à celle de c-Jun, il est plausible que ce dernier participe indirectement au maintien de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α, contribuant ainsi à la plasticité et à l'agressivité des cellules tumorales bronchiques en hypoxie.

- ***Conséquences sur la TEM***

L'adaptation des cellules tumorales bronchiques à un microenvironnement hypoxique constitue un processus majeur, tant pour leur survie que pour l'acquisition d'un phénotype plus agressif et invasif. L'hypoxie intervient comme un facteur important dans l'induction des caractéristiques mésenchymateuses. Dans ce contexte, l'activation de YAP-1, c-Jun et/ou HIF-1α par la kinase NDR2 apparaît comme un mécanisme central dans la régulation de la TEM.

Ces trois co-facteurs de transcription participent à l'induction de l'expression de gènes impliqués dans la migration et l'invasion cellulaires. Ils contribuent à la plasticité phénotypique en favorisant la conversion du caractère épithélial vers un état mésenchymateux, ainsi qu'à la réorganisation de la MEC (Y. Zhao et al., 2023), facilitant ainsi les processus de migration et d'invasion. Nos résultats sont en accord avec ces données, la déplétion de RASSF1A induisant l'activité de YAP-1 modifie la morphologie cellulaire vers un phénotype mésenchymateux, ce qui est cohérent avec les travaux antérieurs (Keller et al., 2019). De plus, l'hypoxie exacerbe ces modifications confortant l'hypothèse de son implication dans la TEM notamment par la perte des jonctions cellulaires (adhérentes ou de jonctions), l'altération de la cyto-architecture, la formation de filopodes *via* l'augmentation de la fascine ainsi que l'allongement des cellules que nous avons pu observer.

- ***Conséquences sur la cyto-architecture***

L'hypoxie est connue pour influencer le cytosquelette, notamment l'expression de la fascine qui est en partie sous le contrôle de HIF-1 (X. Zhao et al., 2014), ce qui est en accord avec nos observations. Dans notre modèle, la déplétion de RASSF1A entraîne une surexpression de la fascine. Cependant, cette régulation ne semble pas dépendre directement de la suractivation de NDR2, son inhibition n'ayant aucun effet notable sur l'expression de la fascine. D'autres mécanismes, probablement davantage liés à l'hypoxie elle-même ou à l'activation de facteurs de transcription associés à la TEM (tels que Snail ou Slug), pourraient être responsables de cette induction (Lin et al., 2021). Bien que NDR2 ne semble pas directement impliquée dans la régulation de la fascine, cette kinase joue néanmoins un rôle clé dans la modulation du ratio N-cadhérine/E-cadhérine, contribuant ainsi à la mise en place d'un programme de TEM, particulièrement en condition hypoxique.

- ***Conséquences sur la capacité migratoire des cellules de CBNPC***

Ces différentes adaptations phénotypiques ont favorisé une migration individuelle et amiboïde. Ce phénomène est amplifié en cas de déplétion de RASSF1A, suggérant que la suractivité de NDR2 et, par conséquent, celle de YAP-1 et c-Jun, contribuent à ces processus. Ces mécanismes restent encore peu décrits dans la littérature, une migration de type amiboïde en condition hypoxique passant par HIF-1α n'ayant été observée, à ce jour, que dans un modèle de cancer de la tête et du cou. Bien que ce type de migration ne soit pas favorable

à la fermeture coordonnée de la blessure dans les tests de migration en 2D, nous avons observé une augmentation significative de la vitesse de déplacement cellulaire, malgré une désorganisation de celle-ci. Ce comportement pourrait résulter de l'augmentation de l'expression de la fascine, une protéine qui interagit avec le cytosquelette d'actine et facilite la réorganisation des adhésions focales en modulant l'architecture des fibres de stress (Elkhatib et al., 2014). Fait intéressant, dans le cancer hépatocellulaire, l'hypoxie induit une forte expression de la fascine, laquelle favorise l'activation de YAP-1, entraînant la TEM et une migration accrue (Pu et al., 2021). Un mécanisme similaire pourrait être impliqué dans les cellules de CBNPC, d'autant plus que des liens fonctionnels entre les protéines Rho, impliquées dans le remodelage du cytosquelette, et l'activation de YAP-1 ont été mis en évidence dans ce type tumoral (Keller et al., 2019).

NDR2 apparaît comme un acteur clé dans l'établissement des métastases cérébrales d'origine bronchique. Dans un modèle murin de métastases cérébrales, sa déplétion entraîne une réduction marquée du volume tumorale. Cette inhibition tumorale s'accompagne d'une baisse de l'activité de YAP-1 et de c-Jun, soulignant l'implication de NDR2 dans la progression métastatique *via* ces deux effecteurs, comme observé *in vitro*. En revanche, aucune corrélation entre l'expression de NDR2 et celle de YAP-1 ou c-Jun n'a été retrouvée dans les prélèvements de patients atteints de CBNPC, qu'ils soient métastatiques ou non. Cependant, nous avons constaté une expression plus importante de NDR2 dans les CBNPC métastatiques par rapport aux localisés rendant compte de son implication dans l'agressivité et la dissémination métastatique des cellules de CBNPC comme observé en *in vitro*. Toutefois, l'expression de YAP-1 ne varie pas entre les différents prélèvements tumoraux, une étude de son activité serait nécessaire pour déterminer son implication des ces processus et si elle est dépendante de l'activité de NDR2. Il en va de même avec c-Jun.

Ces résultats ont renforcé notre volonté de mieux caractériser la kinase NDR2 et ses effets pro-métastatiques. Une compréhension plus approfondie du champ d'action de NDR2 dans le contexte tumoral, ainsi que l'identification de ses partenaires moléculaires, permettraient de considérer ces protéines comme de potentielles cibles thérapeutiques.

**NDR2 et ses possibles nouveaux partenaires dont ATG9, une protéine de l'autophagie**

L'établissement de l'interactome de NDR2 a permis d'identifier plusieurs partenaires potentiels. Cette analyse a été réalisée à partir de lignées cellulaires bronchiques représentant différents stades de la carcinogenèse, allant de cellules saines (HBEC-3) à des cellules issues de tumeurs primaires (H2030), jusqu'à des métastases cérébrales (H2030-BrM3). L'étude comparative de ces lignées a révélé des variations dans les profils d'interaction de NDR2, suggérant que ses fonctions sont fortement dépendantes du contexte cellulaire. Ces différences d'interactants soulignent la plasticité fonctionnelle de NDR2 au cours de la progression tumorale. Par ailleurs, certaines des protéines identifiées sont en lien direct avec les processus biologiques dans lesquels NDR2 a déjà été impliqué, renforçant ainsi la pertinence fonctionnelle de cet interactome.

C'est le cas notamment de la protéine MPZL1 (myelin protein zero-like 1) qui est impliquée dans la migration, l'invasion et la formation des métastases dans les CBNPC (J. Feng et al., 2022; A. Wang et al., 2023). La protéine VAV2 (Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 2) est un échangeur de GTP capable d'activer Rac1, Cdc42 et RhoA, conduisant à la migration et à la prolifération cellulaire (Abe et al., 2000). Un mécanisme de régulation des protéines Rho par NDR2 a déjà été mis en évidence (Keller et al., 2019), suggérant que, de manière similaire, NDR2 pourrait favoriser l'activation de VAV2 et ainsi promouvoir la migration cellulaire. Il est intéressant de noter que, dans le cancer du sein, MST3, une kinase connue pour activer NDR2, interagit avec VAV2, induisant l'activation de Rac1 (Cho et al., 2016), laissant penser à une certaine proximité entre ces protéines. Nous avons également identifié eIF3H (Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit H), une protéine impliquée dans la régulation positive de HIF-1α (Hutt et al., 2014), pouvant potentiellement rendre compte de l'action de NDR2 sur HIF-1α observée (Levallet et al., 2023). Toutefois, toutes les interactions connues de NDR2 n'ont pas été retrouvées dans notre analyse. En particulier, des partenaires bien établis tels que MST3 ou encore YAP-1/TAZ n'ont pas été détectés, tandis que GEF-H1 et Mob2 n'ont été identifiés que dans une seule des lignées cellulaires étudiées. Ces absences peuvent refléter des interactions transitoires, une régulation contextuelle ou des limites techniques inhérentes à l'approche utilisée.

Bien que les profils d'interaction varient entre les différentes lignées cellulaires, plusieurs protéines identifiées dans notre analyse sont impliquées dans les processus autophagiques :

- RME-8/DNAJC13 (Receptor Mediated Endocytosis 8 / DnaJ Heat Shock Protein Family Member C13) a été retrouvée dans l'interactome des trois lignées cellulaires analysées. Cette protéine, localisée au niveau des structures membranaires telles que les endosomes, joue un rôle clé dans le tri, le transport et le recyclage des protéines. Elle participe également à la régulation de l'autophagie par la régulation du trafic de l'ATG9A (Besemer et al., 2020), ainsi que par la formation de l'autolysosome (Swords et al., 2023).
- ATG13, identifiée dans la lignée H2030, protéine du complexe ULK, est importante dans l'activation de l'autophagie et à la capacité d'interagir avec ATG9A (Kannangara et al., 2021).
- YWHAZ présente dans l'interactome des HBEC-3, réprime l'activité de TFEB, un facteur de transcription important dans l'autophagie et la formation des lysosomes (Z. Zhang et al., 2022).
- EIF2S1 (aussi nommé eIF2a) est identifiée dans l'interactome de NDR1 et de NDR2 dans les cellules HBEC-3. Cette protéine favorise la translocation et l'activation de TFEB et TFE3 (Transcription Factor Binding To IGHM Enhancer 3) notamment lors du stress du RE, induisant l'autophagie (Dang et al., 2023).
- Protéines présentes au niveau de l'appareil de Golgi et du RE dans les H2030-BrM3 telles que :
    - PITPNB (Phosphatidylinositol transfer protein beta) impliqué dans la synthèse de PI4P au niveau du Golgi (Sasaki et al., 2025), favorise le transfert de lipide entre les compartiments membranaires et le trafic membranaire (Xie et al., 2018; K. Park et al., 2025)
    - ST3GAL2 (ST3 β-galactoside α-2,3-sialyltransférase 2) membre de la famille des sialyltransférases, capable d'induire l'autophagie dans les encéphalopathie hépatique (X. Li, Xiao, et al., 2024)
    - HSP90B1 (Heat Shock Protein 90 Beta Family Member 1) induit la voie PI3K/AKT/mTor réprimant l'autophagie (C. Li et al., 2024)

Ces observations suggèrent un lien potentiel entre NDR2 et la régulation de l'autophagie, dont les modalités pourraient dépendre du contexte cellulaire ou du stade de la carcinogenèse. Cependant, aucune de ces protéines identifiées ne possèdent le motif consensus de

phosphorylation par NDR2 (HxRxxS/T). Une exception notable est la protéine ATG9A qui possède ce motif et qui constitue un point de convergence entre la plupart de ces protéines. Comme précisé précédemment, elle interagit avec RME-8/DNAJC13 et ATG13, elle est transcrite par TFEB/TFE3 et est présente au niveau du Golgi avant d'être contenue dans des vésicules. Bien que non sortie dans l'étude comparative entre NDR1 et NDR2, la protéine ATG9A était présente dans le pool de protéines de l'interactome de NDR2 des cellules H2030-BrM3. De plus, une étude sur l'autophagie dans la neurodégénérescence a pu mettre en avant une relation entre les kinases NDR1/2 et ATG9A.

**NDR2 : une nouvelle actrice de la régulation de l'autophagie des CBNPC ?**

Fort de ces constatations, nous nous sommes intéressés au rôle de NDR2 dans la régulation de l'autophagie dans les cellules de CBNPC, en particulier en lien avec ATG9A. Afin d'étudier ce processus, nous avons induit l'autophagie par une privation nutritive, un stress physiopathologique fréquemment rencontré dans le microenvironnement tumoral. Cette approche nous a permis d'évaluer la contribution de NDR2 à l'activation ou à la régulation des mécanismes autophagiques dans ce contexte.

- ***Une régulation spécifique à NDR2***

À ce jour, peu d'études se sont intéressées spécifiquement au rôle de NDR2 dans l'autophagie. Son implication dans ce processus est généralement rapportée en association avec NDR1, notamment dans le contexte des maladies neurodégénératives, tandis que les données concernant le cancer restent limitées. Dans le cancer du sein, Yang *et al.* ont mis en évidence un rôle de NDR2 dans la répression de l'autophagie *via* l'interaction avec TRIM27 (Tripartite Motif Containing 27) et ULK1, contribuant ainsi à la progression tumorale (Y. Yang et al., 2022). Toutefois, les auteurs ne précisent pas si cet effet est propre à NDR2 ou partagé avec NDR1 dans ce contexte.

Nous rapportons pour la première fois à notre connaissance que NDR2 et non NDR1, est nécessaire au processus autophagique dans les cellules de CBNPC lors d'une privation nutritionnelle. Dans ce contexte, nous avons observé que l'expression de NDR2 était stabilisée, augmentée, contrairement à celle de son homologue NDR1. Ce phénomène avait déjà été mis en évidence dans des conditions d'hypoxie. Ces données suggèrent que

contrairement à NDR1, NDR2 semble jouer un rôle clé dans la réponse cellulaire à deux types de stress majeurs : le stress hypoxique et le stress nutritif.

- ***Une régulation transcriptionnelle***

Concernant la privation nutritive, NDR2 favorise l'activation de l'autophagie, permettant aux cellules de compenser le manque de nutriments en restaurant leur réserve énergétique. Cette action sur les processus autophagiques passe par la régulation de l'expression de LC3. Cette protéine est nécessaire à la formation de l'autophagosome. NDR2 favorise l'expression de LC3, au niveau des ARN et des protéines, suggérant une régulation transcriptionnelle. Toutefois, en tant que protéine cytosolique, NDR2 ne peut exercer cette régulation de manière directe. Comme évoqué précédemment, NDR2 est capable d'activer YAP-1, qui peut induire dans certain cas l'expression de LC3. En condition de famine, la déplétion de NDR2 compromet l'activité de YAP-1, suggérant une potentielle régulation de l'expression de LC3 par YAP-1 dans les cellules de CBNPC. Cependant, l'action de YAP-1 sur l'expression de LC3 dépend de son interaction avec TFEB, pour lequel nous n'avons pas observé d'altération de son activation dans ces conditions. Toutefois, d'autres facteurs de transcriptions peuvent conduire à l'expression de LC3 comme TFE3 ou c-Jun, ce dernier pouvant être activé par NDR2.

Nous avons pu constater que l'évolution de l'expression de LC3 au cours d'une privation de 24h diffère lors de la perte de NDR2, montrant bien un retard dans sa régulation transcriptionnelle, suggérant la mise en place d'un mécanisme compensatoire pour assurer la survie des cellules. Toutefois ce processus reste moins efficace engendrant une accumulation d'agrégats, de lysosomes. De plus, NDR2 semble également réguler l'expression de SQSTM1/p62 selon l'avancement tumoral. Une diminution de son expression est notamment présente lors de la déplétion de NDR2 dans les cellules H2030-BrM3 (modèle métastatique), ce qui n'est pas le cas dans les cellules H2030 (modèle CBNPC primitif). Ce résultat fait écho aux travaux de Park et al., qui ont montré que YAP-1 favorise la transcription de *SQSTM1/p62* dans les cellules tumorales bronchiques (H. S. Park et al., 2021). Dans notre étude, la perte de NDR2 s'accompagne d'une diminution de l'activité de YAP-1, ce qui pourrait expliquer la réduction observée de la transcription de *SQSTM1/p62*. Toutefois, dans les cellules H2030, bien qu'une répression de l'activité de YAP-1 soit également détectée, aucun effet n'est observé sur l'expression de *SQSTM1/p62*. Ces résultats suggèrent que *SQSTM1/p62* pourrait être régulé par d'autres facteurs de transcription selon le contexte cellulaire, ou que

l'implication de YAP-1 dans sa régulation varie selon les lignées. Ainsi, NDR2 pourrait jouer un rôle central dans la régulation transcriptionnelle de gènes clés de l'autophagie, en modulant l'activité de différents facteurs de transcription de manière contextuelle.

- ***NDR2, ATG9A et la biogenèse des autophagosomes***

La régulation de NDR2 dans la biogenèse des autophagosomes implique également ATG9A, une protéine clé du trafic vésiculaire. Nos résultats indiquent une interaction fonctionnelle entre NDR2 et ATG9A, influençant sa distribution subcellulaire. Un trafic correct d'ATG9A est essentiel à l'approvisionnement en lipides et protéines pour l'expansion du phagophore, et sa perturbation compromet la formation des autophagosomes. Dans les cellules de CBNPC, la déplétion de NDR2 altère le trafic d'ATG9A et s'accompagne d'une fragmentation de l'appareil de Golgi, principal site de localisation d'ATG9A. Il reste à déterminer si ces deux événements sont liés. Alors qu'un stress thermique peut induire une fragmentation du Golgi *via* ATG9A (Q. Luo et al., 2022), la privation de sérum dans notre modèle condense plutôt le Golgi, et la déplétion d'ATG9A entraîne sa fragmentation. Ces observations suggèrent un rôle de NDR2 dans le maintien de l'intégrité du Golgi, potentiellement médié par ATG9A. Toutefois, d'autres régulateurs d'ATG9A n'ont pas montré d'effet similaire sur le Golgi, appuyant l'idée que la fragmentation du Golgi et la mauvaise distribution d'ATG9A pourraient être deux processus distincts mais interconnectés en aval de NDR2.

Le trafic d'ATG9A est également régulé par RUSC2, une protéine accessoire du complexe AP-4 localisée au niveau de l'appareil de Golgi (Guardia et al., 2021). RUSC2 possède un motif consensus de phosphorylation reconnu par NDR2, suggérant une régulation possible de cette protéine par NDR2. Bien que nous ayons mis en évidence une interaction directe entre NDR2 et ATG9A, il est plausible que NDR2 régule également le trafic d'ATG9A *via* RUSC2. En se liant aux kinésines, RUSC2 favorise le transport des vésicules contenant ATG9A le long des microtubules vers la périphérie cellulaire (Guardia et al., 2021). Ce mécanisme pourrait s'inscrire dans un processus complémentaire à celui décrit par Campisi et al., où les vésicules ATG9A participent au transport des intégrines vers la membrane plasmique, facilitant la migration des cellules de glioblastome (Campisi et al., 2022).

Dans nos modèles de CBNPC, l'interaction NDR2–ATG9A semble essentielle à la migration des cellules, indépendamment des conditions de privation. Toutefois, bien que nous constations une diminution de la vitesse de migration après déplétion de NDR2 ou ATG9A, nous n'avons pas établi de lien direct entre ce défaut migratoire et la réduction de l'autophagie. Cela laisse ouverte la possibilité d'un mécanisme autophagie-indépendant, dans lequel ATG9A, *via* le transport ciblé de vésicules enrichies en intégrines, pourrait jouer un rôle clé dans les fonctions pro-migratoires de NDR2. De plus, une diminution de la localisation de la N-cadhérine à la membrane plasmique est observée lors de la déplétion de NDR2 et/ou ATG9A, avec une localisation davantage périnucléaire. Le transport de la N-cadhérine vers la membrane semble perturbé suggérant que NDR2 et ATG9A sont nécessaire à son trafic. À l'image des intégrines, les vésicules ATG9A pourraient ainsi acheminer la N-cadhérine à la membrane plasmique, contribuant à la migration cellulaire.

L'axe NDR2–ATG9A pourrait favoriser la progression des CBNPC *via* l'activation de l'autophagie. D'une part, l'expression d'ATG9A tend à être plus élevée dans les CBNPC métastatiques par rapport aux formes localisées, à l'instar de NDR2, également surexprimée dans ces tumeurs avancées. D'autre part, la déplétion simultanée de NDR2 et d'ATG9A n'entraîne pas de réduction supplémentaire de l'autophagie par rapport à la perte de l'une ou l'autre de ces protéines, suggérant une convergence fonctionnelle dans la régulation de ce processus. Par ailleurs, l'interactome de NDR2 révèle une interaction avec la protéine ATG13, un composant central du complexe ULK responsable de l'initiation de l'autophagie. Il est établi qu'ATG9A peut interagir avec ATG13 indépendamment d'ULK1, participant ainsi à l'induction de l'autophagie (Kannangara et al., 2021). Dans ce contexte, il est plausible que NDR2 facilite le trafic ou l'interaction d'ATG9A avec ATG13, en agissant comme une protéine d'échafaudage, comme c'est le cas lors de la formation du complexe TRIM27-NDR2-ULK1 (Y. Yang et al., 2022).

Parmi ses fonctions essentielles, l'activité de « brouilleuse lipidique » d'ATG9A joue un rôle déterminant dans la formation des autophagosomes. Conformément aux travaux de Mailler et al., nous observons dans nos modèles de CBNPC une accumulation de gouttelettes lipidiques consécutive à l'inhibition d'ATG9A (Mailler et al., 2021), phénomène également constaté lors de la déplétion de NDR2, seule ou combinée à celle d'ATG9A (données non

montrées). Ces résultats suggèrent que l'axe NDR2–ATG9A pourrait contribuer à la formation des autophagosomes en facilitant l'apport de lipides nécessaires à l'expansion de la membrane du phagophore.

Nos données indiquent que NDR2 intervient dans les étapes précoces de l'autophagie, notamment à travers la régulation de LC3 et du trafic d'ATG9A, éléments essentiels à la biogenèse des autophagosomes. Cependant, une étude récente a mis en évidence un rôle additionnel d'ATG9A dans la fermeture du phagophore, *via* une interaction directe avec le complexe ESCRT-III (Javed et al., 2025). Dès lors, il est légitime de s'interroger sur une possible implication de NDR2 dans cette étape terminale de la formation des autophagosomes par le biais de son interaction avec ATG9A.

La fermeture correcte du phagophore conditionne la fusion efficace de l'autophagosome avec les lysosomes. Or, dans nos modèles, la déplétion de NDR2 entraîne une accumulation de lysosomes en région périnucléaire. Ces derniers dérivent à la fois du RE et de l'appareil de Golgi, dont la fragmentation induite par la perte de NDR2 pourrait perturber la biogenèse lysosomale. En ce sens, NDR2 pourrait exercer un double effet sur la régulation des lysosomes : d'une part, en limitant la formation des autophagosomes, il entrave la fusion autophagosome–lysosome, entraînant une accumulation de lysosomes ; d'autre part, en altérant la structure du Golgi, il pourrait directement nuire à leur biogenèse.

Bien que l'effet principal de NDR2 semble concerner la biogenèse des autophagosomes, sa déplétion conduit également à l'accumulation d'agrégats protéiques et à une réduction des capacités prolifératives cellulaires. Il serait pertinent de déterminer si la perte de NDR2 en condition de privation nutritionnelle affecte la reconstitution du pool énergétique cellulaire. Une telle analyse permettrait de clarifier si NDR2 participe à une forme d'autophagie sélective, orientée vers la dégradation des agrégats protéiques, ou s'il joue un rôle plus général dans le recyclage cytoprotecteur.

# CONCLUSION/PERSPECTIVES

Le cancer bronchique représente l'une des principales causes de mortalité par cancer, tant en France qu'à l'échelle mondiale. Une compréhension approfondie des mécanismes moléculaires sous-jacents à la tumorigenèse bronchique est essentielle pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Notre travail s'inscrit dans cette démarche, visant à mieux appréhender ces mécanismes afin d'identifier de nouvelles cibles permettant d'endiguer la progression tumorale. Des travaux antérieurs menés par notre équipe ont mis en évidence une dérégulation de la voie Hippo dans le contexte du cancer bronchique, et ont établi les premières bases du rôle de la kinase NDR2 dans ce processus (de Fraipont et al., 2012; Dubois et al., 2016; Keller et al., 2019).

Ce travail met en lumière l'implication centrale de NDR2 dans la carcinogenèse bronchique et dans la progression métastatique, à plusieurs niveaux. Il a permis de mieux comprendre le rôle de NDR2 non seulement dans la réponse au microenvironnement tumoral, en particulier en conditions de stress telles que l'hypoxie ou la dénutrition, mais également dans les mécanismes cellulaires impliqués dans la migration et la dissémination métastatique. Les avancées et précisions apportées par ce travail sur l'implication de NDR2 dans les CBNPC soulèvent de nouvelles interrogations et ouvrent de nouvelles perspectives.

**Dans quelles conditions NDR2 favorise l'initiation de l'autophagie ?**

Ce travail a mis en évidence l'implication de NDR2 dans le processus autophagique. Il serait pertinent d'approfondir la compréhension du rôle de NDR2 dans ce mécanisme, afin de déterminer si son action est spécifique à une privation nutritive ou si NDR2 peut également activer l'autophagie en réponse à d'autres situations de stress cellulaire, telles que l'hypoxie ou le détachement de la MEC. En effet, compte tenu du rôle de NDR2 dans la réponse à l'hypoxie ainsi que dans la régulation des facteurs de transcription YAP-1, c-Jun et HIF-1α, il est plausible que NDR2 soit impliquée dans la modulation de gènes associés à l'autophagie et par conséquent à l'activation de celle-ci. Comme mentionné précédemment, YAP-1 et c-Jun participent à la régulation de LC3, tandis que la voie HIF peut, dans certains contextes, induire l'autophagie. Il serait donc cohérent de supposer que NDR2 puisse également activer l'autophagie dans des conditions hypoxiques.

Le détachement de la MEC constitue une étape cruciale dans le processus d'invasion tumorale, permettant aux cellules cancéreuses non seulement de coloniser les tissus environnants, mais également d'accéder à la circulation sanguine. Toutefois, ce détachement induit généralement la mort par anoïkis. L'autophagie est l'un des mécanismes connus permettant aux cellules de résister à l'anoïkis, favorisant ainsi leur survie en conditions de stress.

Dans ce contexte, il serait intéressant d'examiner si NDR2 joue un rôle dans l'échappement à l'anoïkis, en particulier en régulant l'autophagie. NDR2 est également impliquée dans l'activation de HIF-1, un facteur de transcription reconnu pour sa contribution à la survie cellulaire en conditions de détachement.

Par ailleurs, il serait pertinent d'approfondir le rôle de NDR2 et de l'autophagie dans les processus de migration et d'invasion cellulaire. Nos résultats indiquent à plusieurs reprises que NDR2 favorise la migration cellulaire. Or, l'autophagie est connue pour participer au renouvellement des plaques d'adhésion focale, un mécanisme essentiel à la dynamique migratoire des cellules (Lock et al., 2014; Sharifi et al., 2016). De plus, l'autophagie interagit étroitement avec les protéines de la famille Rho, qui régulent la migration cellulaire par leur action sur le cytosquelette d'actine (Dikic & Elazar, 2018). NDR2 interagit également avec ces protéines Rho (Keller et al., 2019), suggérant une convergence des voies de signalisation impliquant NDR2, l'autophagie et les protéines Rho. Cette interaction pourrait ainsi faciliter le remodelage des structures d'adhésion et promouvoir la migration cellulaire.

**NDR2, un gestionnaire du stress cellulaire ?**

Les données actuelles suggèrent que NDR2 pourrait jouer un rôle central dans la gestion du stress cellulaire, en particulier dans des contextes pathologiques comme la carcinogenèse. Son implication dans la régulation de l'autophagie, de la mitophagie, de la réponse à l'hypoxie et de la migration cellulaire positionne NDR2 comme un intégrateur de multiples signaux de stress (Z. Wu et al., 2013; Keller et al., 2019; Y. Yang et al., 2022; Levallet et al., 2023; Roşianu et al., 2023; Biojout et al, soumis)**.** Ces fonctions convergent vers la promotion de la survie, de l'adaptation et de la plasticité des cellules tumorales soumises à des environnements hostiles (hypoxie, carence en nutriments). Il serait pertinent d'explorer si NDR2 contribue à la survie

cellulaire et à l'activation de voies de signalisation adaptatives, en particulier dans des conditions de stress telles que celles rencontrées par les CTC. En effet, nos résultats, ainsi que ceux d'autres études, ont mis en évidence l'implication de NDR2 dans plusieurs processus clés du développement tumoral, notamment la survie, la prolifération, la migration et l'invasion dans les CBNPC (Keller et al., 2019; Levallet et al., 2023; Cheng et al., 2024). Nous avons également montré que NDR2 favorise l'implantation des cellules tumorales au niveau cérébral, ainsi que la formation de métastases cérébrales. Cependant, le rôle de NDR2 dans les CTC demeure largement inexploré. Or, les CTC évoluent dans un environnement extrêmement hostile, caractérisé par un apport limité en nutriments et en oxygène, une forte pression d'anoïkis due au détachement de la matrice extracellulaire, ainsi que par un stress mécanique important, induit par les forces de cisaillement du flux sanguin.
Dans ce contexte, étudier l'implication de NDR2 dans les mécanismes d'adaptation des CTC apparaît comme une piste prometteuse. Cela permettrait de mieux comprendre comment certaines cellules parviennent à résister à ces contraintes et à initier des métastases.

**La place de la voie Hippo dans les actions pro-tumorales de NDR2**

Dans les CBNPC, la voie Hippo est fortement altérée engendrant l'activation paradoxale de NDR2 et de YAP-1. En conditions physiologiques, l'activation de NDR2 entraîne l'inhibition de YAP-1 par induction de sa dégradation protéasomale. Cependant, dans le contexte du CBNPC, l'activation de NDR2 coïncide avec celle de YAP-1. Cette régulation de YAP-1 par NDR2 est alors indirecte. En effet, l'effet de NDR2 sur YAP-1 peut être médié par la protéine RhoA (Stegert et al., 2005 ; Lee et al., 2019) et l'inactivation concomitante de RhoB (Keller et al. 2019), suggérant un mécanisme d'activation décalé et complexe, dépendant de la voie de signalisation Rho, qui regroupe des membres de très fortes homologies mais pouvant avoir des actions opposées (RhoA promigratoire, RhoB antimigratoire) (Bousquet et al., 2009).

Aussi bien en condition hypoxique que lors de privation nutritive, la perte de NDR2 entraîne une diminution significative de l'activité de YAP-1, suggérant que NDR2 est nécessaire à l'activation de YAP-1 dans ces contextes. Comprendre les mécanismes sous-jacents à cette régulation est essentiel pour mieux appréhender la relation fonctionnelle entre ces deux protéines et leurs actions conjointes dans les CBNPC. Il est crucial de déterminer dans quelle mesure NDR2 influence l'activité de YAP-1, mais également d'évaluer la part que cette

activation représente dans les effets pro-oncogéniques attribués à NDR2. En effet, l'inhibition isolée de YAP-1 ne reproduit pas toujours l'ensemble des effets observés lors de l'inhibition de NDR2, ce qui suggère que NDR2 exerce ses fonctions *via* d'autres voies.

Le rôle des membres de la voie Hippo, et en particulier des kinases MST, dans la régulation de NDR2 au cours de la carcinogenèse bronchique reste encore peu documenté. Parmi celles-ci, MST3 est considérée comme la kinase la plus spécifique pour l'activation de NDR2 (Stegert et al., 2005). Cependant, l'expression de MST3, ainsi que celle de MST1/2, est fortement réduite en condition d'hypoxie ou de privation nutritionnelle (Levallet et al, 2023, Biojout et al, soumis). Cela suggère que dans ces contextes de stress, NDR2 pourrait être activée indépendamment des voies canoniques de la cascade Hippo. Cette observation soulève la question de la régulation de NDR2 en condition classique de culture cellulaire : est-elle activée par des mécanismes alternatifs, indépendants de MST ? Une telle régulation non canonique reste à explorer aussi bien en condition normale que de stress. Identifier précisément les kinases ou cofacteurs responsables de l'activation de NDR2 permettrait de mieux comprendre son rôle dans la progression tumorale, mais également d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour bloquer son activité.

**NDR2, un biomarqueur des cancers bronchiques métastatiques et une cible thérapeutique ?**

NDR2 apparaît comme un biomarqueur potentiel de l'agressivité et de la capacité métastatique des CBNPC, son expression étant significativement augmentée dans les formes métastatiques de la maladie. Toutefois, le ciblage spécifique de NDR2 à l'aide d'inhibiteurs moléculaires représente un défi majeur. Le principal obstacle réside dans la forte homologie (Biojout et al., 2025). Alors que NDR1 est considérée comme un suppresseur de tumeur, NDR2 favorise la progression tumorale (Levallet et al., 2023). Ainsi, une inhibition non spécifique de NDR2 risquerait également de bloquer NDR1, compromettant l'efficacité thérapeutique et pouvant même s'avérer contre-productive.

Afin de palier à la limite d'une inhibition par molécule pharmaceutique conventionnelle, nous nous sommes intéressés à l'identification de partenaires spécifiques de NDR2, dans le but de découvrir des cibles moléculaires associées à son activité pro-tumorale et pro-métastatique. Une telle approche pourrait permettre de contourner les difficultés liées à l'homologie entre NDR1 et NDR2 et d'élaborer des stratégies thérapeutiques plus ciblées. Toutefois, compte

tenu du nombre potentiellement élevé de partenaires de NDR2 et de la diversité de ses fonctions dans la carcinogenèse, l'inhibition d'un seul de ces partenaires pourrait s'avérer insuffisant pour abroger tous les effets pro-tumoraux de NDR2. La mise en place d'une stratégie alternative visant à contrer les effets de NDR2 apparaît donc nécessaire. Parmi les approches envisageables, l'inhibition de NDR2 par interférence ARN (siARN) semble particulièrement prometteuse. En effet, les siARN présentent une grande spécificité de ciblage, permettant une régulation fine de l'expression génique, tout en limitant les effets hors cibles, notamment vis-à-vis de NDR1.

# BIBLIOGRAPHIE


Abbi, S., Ueda, H., Zheng, C., Cooper, L. A., Zhao, J., Christopher, R., & Guan, J.-L. (2002). Regulation of Focal Adhesion Kinase by a Novel Protein Inhibitor FIP200. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(9), 3178-3191. https://doi.org/10.1091/mbc.e02-05-0295

Abe, K., Rossman, K. L., Liu, B., Ritola, K. D., Chiang, D., Campbell, S. L., Burridge, K., & Der, C. J. (2000). Vav2 is an activator of Cdc42, Rac1, and RhoA. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(14), 10141-10149. https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.10141

Achrol, A. S., Rennert, R. C., Anders, C., Soffietti, R., Ahluwalia, M. S., Nayak, L., Peters, S., Arvold, N. D., Harsh, G. R., Steeg, P. S., & Chang, S. D. (2019). Brain metastases. *Nature Reviews. Disease Primers*, *5*(1), 5. https://doi.org/10.1038/s41572-018-0055-y

Aguilera, M. O., Berón, W., & Colombo, M. I. (2012). The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy*, *8*(11), 1590-1603. https://doi.org/10.4161/auto.21459

Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature reviews. Cancer*, *7*(11), 834-846. https://doi.org/10.1038/nrc2256

Ahmed-Choudhury, J., Agathanggelou, A., Fenton, S. L., Ricketts, C., Clark, G. J., Maher, E. R., & Latif, F. (2005). Transcriptional Regulation of Cyclin A2 by RASSF1A through the Enhanced Binding of p120E4F to the Cyclin A2 Promoter. *Cancer Research*, *65*(7), 2690-2697. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3593

Alam, M., Alam, S., Shamsi, A., Adnan, M., Elasbali, A. M., Al-Soud, W. A., Alreshidi, M., Hawsawi, Y. M., Tippana, A., Pasupuleti, V. R., & Hassan, M. I. (2022). Bax/Bcl-2 Cascade Is Regulated by the EGFR Pathway : Therapeutic Targeting of Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.869672

Alfranca, A., Gutiérrez, M. D., Vara, A., Aragonés, J., Vidal, F., & Landázuri, M. O. (2002). C-Jun and hypoxia-inducible factor 1 functionally cooperate in hypoxia-induced gene transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(1), 12-22. https://doi.org/10.1128/MCB.22.1.12-22.2002

Amagai, Y., Itoh, T., Fukuda, M., & Mizuno, K. (2015). Rabin8 suppresses autophagosome formation independently of its guanine nucleotide-exchange activity towards Rab8. *Journal of Biochemistry*, *158*(2), 139-153. https://doi.org/10.1093/jb/mvv032

Amato, R., Pisani, F., Laudadio, E., Cammalleri, M., Lucchesi, M., Marracci, S., Filippi, L., Galeazzi, R., Svelto, M., Dal Monte, M., & Bagnoli, P. (2022). HIF-1-Dependent Induction of β3 Adrenoceptor : Evidence from the Mouse Retina. *Cells*, *11*(8), 1271. https://doi.org/10.3390/cells11081271

Anastas, J. N., & Moon, R. T. (2013). WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *13*(1), 11-26. https://doi.org/10.1038/nrc3419

Andrews, L. J., Thornton, Z. A., Saleh, R., Dawson, S., Short, S. C., Daly, R., Higgins, J. P. T., Davies, P., & Kurian, K. M. (2023). Genomic landscape and actionable mutations of brain metastases derived from non–small cell lung cancer : A systematic review. *Neuro-Oncology Advances*, *5*(1). https://doi.org/10.1093/noajnl/vdad145

Aqbi, H. F., Tyutyunyk-Massey, L., Keim, R. C., Butler, S. E., Thekkudan, T., Joshi, S., Smith, T. M., Bandyopadhyay, D., Idowu, M. O., Bear, H. D., Payne, K. K., Gewirtz, D. A., & Manjili, M. H.

(2018). Autophagy-deficient breast cancer shows early tumor recurrence and escape from dormancy. *Oncotarget*, *9*(31), 22113-22122. https://doi.org/10.18632/oncotarget.25197

Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., & Piccolo, S. (2013). A Mechanical Checkpoint Controls Multicellular Growth through YAP/TAZ Regulation by Actin-Processing Factors. *Cell*, *154*(5), 1047-1059. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042

Arnold, J., Schattschneider, J., Blechner, C., Krisp, C., Schlüter, H., Schweizer, M., Nalaskowski, M., Oliveira-Ferrer, L., & Windhorst, S. (2020). Tubulin Tyrosine Ligase Like 4 (TTLL4) overexpression in breast cancer cells is associated with brain metastasis and alters exosome biogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, *39*(1), 205. https://doi.org/10.1186/s13046-020-01712-w

Artal-Martinez de Narvajas, A., Gomez, T. S., Zhang, J.-S., Mann, A. O., Taoda, Y., Gorman, J. A., Herreros-Villanueva, M., Gress, T. M., Ellenrieder, V., Bujanda, L., Kim, D.-H., Kozikowski, A. P., Koenig, A., & Billadeau, D. D. (2013). Epigenetic Regulation of Autophagy by the Methyltransferase G9a. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(20), 3983-3993. https://doi.org/10.1128/MCB.00813-13

Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 9-18. https://doi.org/10.1093/carcin/bgp268

Artinian, N., Cloninger, C., Holmes, B., Benavides-Serrato, A., Bashir, T., & Gera, J. (2015). Phosphorylation of the Hippo Pathway Component AMOTL2 by the mTORC2 Kinase Promotes YAP Signaling, Resulting in Enhanced Glioblastoma Growth and Invasiveness ♦ . *The Journal of Biological Chemistry*, *290*(32), 19387-19401. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656587

Au, S. H., Storey, B. D., Moore, J. C., Tang, Q., Chen, Y.-L., Javaid, S., Sarioglu, A. F., Sullivan, R., Madden, M. W., O'Keefe, R., Haber, D. A., Maheswaran, S., Langenau, D. M., Stott, S. L., & Toner, M. (2016). Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(18), 4947-4952. https://doi.org/10.1073/pnas.1524448113

Avivar-Valderas, A., Salas ,Eduardo, Bobrovnikova-Marjon ,Ekaterina, Diehl ,J. Alan, Nagi ,Chandandeep, Debnath ,Jayanta, & and Aguirre-Ghiso, J. A. (2011). PERK Integrates Autophagy and Oxidative Stress Responses To Promote Survival during Extracellular Matrix Detachment. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(17), 3616-3629. https://doi.org/10.1128/MCB.05164-11

Azad, T., Janse van Rensburg, H. J., Lightbody, E. D., Neveu, B., Champagne, A., Ghaffari, A., Kay, V. R., Hao, Y., Shen, H., Yeung, B., Croy, B. A., Guan, K. L., Pouliot, F., Zhang, J., Nicol, C. J. B., & Yang, X. (2018). A LATS biosensor screen identifies VEGFAR as a regulator of the Hippo pathway in angiogenesis. *Nature Communications*, *9*(1), 1061. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03278-w

Baldacci, S., Kherrouche, Z., Cockenpot, V., Stoven, L., Copin, M. C., Werkmeister, E., Marchand, N., Kyheng, M., Tulasne, D., & Cortot, A. B. (2018). *MET* amplification increases the metastatic spread of EGFR-mutated NSCLC. *Lung Cancer*, *125*, 57-67. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.09.008

Bandyopadhyay, U., Kaushik, S., Varticovski, L., & Cuervo, A. M. (2008). The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(18), 5747-5763. https://doi.org/10.1128/MCB.02070-07

Barlesi, F., Mazieres, J., Merlio, J.-P., Debieuvre, D., Mosser, J., Lena, H., Ouafik, L., Besse, B., Rouquette, I., Westeel, V., Escande, F., Monnet, I., Lemoine, A., Veillon, R., Blons, H., Audigier-Valette, C., Bringuier, P.-P., Lamy, R., Beau-Faller, M., … Biomarkers France contributors. (2016). Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer : Results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT). *Lancet (London, England)*, *387*(10026), 1415-1426. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00004-0

Barrak, N. H., Khajah, M. A., & Luqmani, Y. A. (2020). Hypoxic environment may enhance migration/penetration of endocrine resistant MCF7- derived breast cancer cells through monolayers of other non-invasive cancer cells in vitro. *Scientific Reports*, *10*, 1127. https://doi.org/10.1038/s41598-020-58055-x

Barrow-McGee, R., Kishi, N., Joffre, C., Ménard, L., Hervieu, A., Bakhouche, B. A., Noval, A. J., Mai, A., Guzmán, C., Robbez-Masson, L., Iturrioz, X., Hulit, J., Brennan, C. H., Hart, I. R., Parker, P. J., Ivaska, J., & Kermorgant, S. (2016). Beta 1-integrin–c-Met cooperation reveals an inside-in survival signalling on autophagy-related endomembranes. *Nature Communications*, *7*(1), 11942. https://doi.org/10.1038/ncomms11942

Becker, V., Yuan, X., Boewe, A. S., Ampofo, E., Ebert, E., Hohneck, J., Bohle, R. M., Meese, E., Zhao, Y., Menger, M. D., Laschke, M. W., & Gu, Y. (2023). Hypoxia-induced downregulation of microRNA-186-5p in endothelial cells promotes non-small cell lung cancer angiogenesis by upregulating protein kinase C alpha. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *31*, 421-436. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.01.015

Belaid, A., Cerezo, M., Chargui, A., Corcelle–Termeau, E., Pedeutour, F., Giuliano, S., Ilie, M., Rubera, I., Tauc, M., Barale, S., Bertolotto, C., Brest, P., Vouret-Craviari, V., Klionsky, D. J., Carle, G. F., Hofman, P., & Mograbi, B. (2013). Autophagy Plays a Critical Role in the Degradation of Active RHOA, the Control of Cell Cytokinesis, and Genomic Stability. *Cancer Research*, *73*(14), 4311-4322. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4142

Bellot, G., Garcia-Medina, R., Gounon, P., Chiche, J., Roux, D., Pouysségur, J., & Mazure, N. M. (2009). Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(10), 2570-2581. https://doi.org/10.1128/MCB.00166-09

Bendinelli, P., Maroni, P., Matteucci, E., Luzzati, A., Perrucchini, G., & Desiderio, M. A. (2013). Hypoxia inducible factor-1 is activated by transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) versus WWdomain-containing oxidoreductase (WWOX) in hypoxic microenvironment of bone metastasis from breast cancer. *European Journal of Cancer*, *49*(11), 2608-2618. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.03.002

Bennett, F. C., & Harvey, K. F. (2006). Fat Cadherin Modulates Organ Size in Drosophila via the Salvador/Warts/Hippo Signaling Pathway. *Current Biology*, *16*(21), 2101-2110. https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.045

Bentolila, L. A., Prakash, R., Mihic-Probst, D., Wadehra, M., Kleinman, H. K., Carmichael, T. S., Péault, B., Barnhill, R. L., & Lugassy, C. (2016). Imaging of Angiotropism/Vascular Co-Option in a Murine Model of Brain Melanoma : Implications for Melanoma Progression along Extravascular Pathways. *Scientific Reports*, *6*, 23834. https://doi.org/10.1038/srep23834

Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer : How cellular identity goes awry. *Developmental Cell*, *19*(5), 698-711. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005

Besemer, A. S., Maus, J., Ax, M. D. A., Stein, A., Vo, S., Freese, C., Nalbach, K., von Hilchen, C., Pfalzgraf, I. F., Koziollek-Drechsler, I., Silva, B., Huesmann, H., Boukhallouk, F., Florin, L., Kern, A., Behl,

C., & Clement, A. M. (2020). Receptor-mediated endocytosis 8 (RME-8)/DNAJC13 is a novel positive modulator of autophagy and stabilizes cellular protein homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *78*(2), 645-660. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03521-y

Bhandari, V., Li, C. H., Bristow, R. G., & Boutros, P. C. (2020). Divergent mutational processes distinguish hypoxic and normoxic tumours. *Nature Communications*, *11*, 737. https://doi.org/10.1038/s41467-019-14052-x

Bhatt, V., Lan, T., Wang, W., Kong, J., Lopes, E. C., Wang, J., Khayati, K., Raju, A., Rangel, M., Lopez, E., Hu, Z. S., Luo, X., Su, X., Malhotra, J., Hu, W., Pine, S. R., White, E., & Guo, J. Y. (2023). Inhibition of autophagy and MEK promotes ferroptosis in Lkb1-deficient Kras-driven lung tumors. *Cell Death & Disease*, *14*(1), 61. https://doi.org/10.1038/s41419-023-05592-8

Bied, M., Ho, W. W., Ginhoux, F., & Blériot, C. (2023). Roles of macrophages in tumor development : A spatiotemporal perspective. *Cellular & Molecular Immunology*, *20*(9), 983-992. https://doi.org/10.1038/s41423-023-01061-6

Biojout, T., Bergot, E., Bernay, B., Levallet, G., & Levallet, J. (2025). NDR2 kinase : A review of its physiological role and involvement in carcinogenesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *311*, 143656. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143656

Bissell, M. J., & Barcellos-Hoff, M. H. (1987). The Influence of Extracellular Matrix on Gene Expression : Is Structure The Message? *Journal of Cell Science*, *1987*(Supplement_8), 327-343. https://doi.org/10.1242/jcs.1987.Supplement_8.18

Bjørkøy, G., Lamark ,Trond, & and Johansen, T. (2006). p62/SQSTM1 : A Missing Link between Protein Aggregates and the Autophagy Machinery. *Autophagy*, *2*(2), 138-139. https://doi.org/10.4161/auto.2.2.2405

Blouw, B., Song, H., Tihan, T., Bosze, J., Ferrara, N., Gerber, H.-P., Johnson, R. S., & Bergers, G. (2003). The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell*, *4*(2), 133-146. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00194-6

Boire, A., Brastianos, P. K., Garzia, L., & Valiente, M. (2020). Brain metastasis. *Nature Reviews Cancer*, *20*(1), 4-11. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0220-y

Booth, L., Roberts, J. L., Poklepovic, A., & Dent, P. (2017). [Pemetrexed + sildenafil], via autophagy-dependent HDAC downregulation, enhances the immunotherapy response of NSCLC cells. *Cancer Biology & Therapy*, *18*(9), 705-714. https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1362511

Bora-Singhal, N., Saha, B., Mohankumar, D., Padmanabhan, J., Coppola, D., & Chellappan, S. (2022). A Novel PHD2/VHL-mediated Regulation of YAP1 Contributes to VEGFA Expression and Angiogenesis. *Cancer Research Communications*, *2*(7), 624-638. https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-21-0084

Bos, P. D., Zhang, X. H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R. R., Nguyen, D. X., Minn, A. J., Van de Vijver, M., Gerald, W., Foekens, J. A., & Massagué, J. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*, *459*(7249), 1005-1009. https://doi.org/10.1038/nature08021

Boya, P., González-Polo, R.-A., Casares, N., Perfettini, J.-L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., & Kroemer, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(3), 1025-1040. https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005

Bracht, J. W. P., Mayo-de-las-Casas, C., Berenguer, J., Karachaliou, N., & Rosell, R. (2018). The Present and Future of Liquid Biopsies in Non-Small Cell Lung Cancer : Combining Four Biosources for Diagnosis, Prognosis, Prediction, and Disease Monitoring. *Current Oncology Reports*, *20*(9), 70. https://doi.org/10.1007/s11912-018-0720-z

Bracken, C. P., Fedele, A. O., Linke, S., Balrak, W., Lisy, K., Whitelaw, M. L., & Peet, D. J. (2006). Cell-specific Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1α and HIF-2α Stabilization and Transactivation in a Graded Oxygen Environment *. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(32), 22575-22585. https://doi.org/10.1074/jbc.M600288200

Brambilla, E., & Gazdar, A. (2009). Pathogenesis of lung cancer signalling pathways : Roadmap for therapies. *The European Respiratory Journal*, *33*(6), 1485-1497. https://doi.org/10.1183/09031936.00014009

Brambilla, E., Negoescu, A., Gazzeri, S., Lantuejoul, S., Moro, D., Brambilla, C., & Coll, J. L. (1996). Apoptosis-related factors p53, Bcl2, and Bax in neuroendocrine lung tumors. *The American Journal of Pathology*, *149*(6), 1941-1952.

Bristow, R. G., & Hill, R. P. (2008). Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews Cancer*, *8*(3), 180-192. https://doi.org/10.1038/nrc2344

Broadbent, D., Barnaba, C., & Schmidt, J. C. (s. d.). Tracking the transition from an ATG9A vesicle to an autophagosome. *Autophagy*, *20*(4), 976-977. https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2232641

Broadbent, D. G., Barnaba, C., Perez, G. I., & Schmidt, J. C. (2023). Quantitative analysis of autophagy reveals the role of ATG9 and ATG2 in autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, *222*(7), e202210078. https://doi.org/10.1083/jcb.202210078

Burns, J. M., Summers, B. C., Wang, Y., Melikian, A., Berahovich, R., Miao, Z., Penfold, M. E. T., Sunshine, M. J., Littman, D. R., Kuo, C. J., Wei, K., McMaster, B. E., Wright, K., Howard, M. C., & Schall, T. J. (2006). A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(9), 2201-2213. https://doi.org/10.1084/jem.20052144

Cai, J., Zhang, N., Zheng, Y., de Wilde, R. F., Maitra, A., & Pan, D. (2010). The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program. *Genes & Development*, *24*(21), 2383-2388. https://doi.org/10.1101/gad.1978810

Caino, M. C., Chae, Y. C., Vaira, V., Ferrero, S., Nosotti, M., Martin, N. M., Weeraratna, A., O'Connell, M., Jernigan, D., Fatatis, A., Languino, L. R., Bosari, S., & Altieri, D. C. (2013). Metabolic stress regulates cytoskeletal dynamics and metastasis of cancer cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(7), 2907-2920. https://doi.org/10.1172/JCI67841

Cairns, R. A., & Hill, R. P. (2004). Acute hypoxia enhances spontaneous lymph node metastasis in an orthotopic murine model of human cervical carcinoma. *Cancer Research*, *64*(6), 2054-2061. https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3196

Camargo, F. D., Gokhale, S., Johnnidis, J. B., Fu, D., Bell, G. W., Jaenisch, R., & Brummelkamp, T. R. (2007). YAP1 Increases Organ Size and Expands Undifferentiated Progenitor Cells. *Current Biology*, *17*(23), 2054-2060. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.10.039

Campisi, D., Desrues, L., Dembélé, K.-P., Mutel, A., Parment, R., Gandolfo, P., Castel, H., & Morin, F. (2022). The core autophagy protein ATG9A controls dynamics of cell protrusions and directed migration. *The Journal of Cell Biology*, *221*(3), e202106014. https://doi.org/10.1083/jcb.202106014

Carbonell, W. S., Ansorge, O., Sibson, N., & Muschel, R. (2009). The Vascular Basement Membrane as "Soil" in Brain Metastasis. *PLoS ONE*, *4*(6), e5857. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005857

Carlsson, S. R., & Simonsen, A. (2015). Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Science*, *128*(2), 193-205. https://doi.org/10.1242/jcs.141036

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.-M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., & Keshet, E. (1998). Role of HIF-1α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, *394*(6692), 485-490. https://doi.org/10.1038/28867

Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *10*(6), 417-427. https://doi.org/10.1038/nrd3455

Carroll, B., Mohd-Naim, N., Maximiano, F., Frasa, M. A., McCormack, J., Finelli, M., Thoresen, S. B., Perdios, L., Daigaku, R., Francis, R. E., Futter, C., Dikic, I., & Braga, V. M. M. (2013). The TBC/RabGAP Armus Coordinates Rac1 and Rab7 Functions during Autophagy. *Developmental Cell*, *25*(1), 15-28. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.03.005

Carroll, B., Nelson, G., Rabanal-Ruiz, Y., Kucheryavenko, O., Dunhill-Turner, N. A., Chesterman, C. C., Zahari, Q., Zhang, T., Conduit, S. E., Mitchell, C. A., Maddocks, O. D. K., Lovat, P., von Zglinicki, T., & Korolchuk, V. I. (2017). Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *The Journal of Cell Biology*, *216*(7), 1949-1957. https://doi.org/10.1083/jcb.201610113

Catalano, M., D'Alessandro, G., Lepore, F., Corazzari, M., Caldarola, S., Valacca, C., Faienza, F., Esposito, V., Limatola, C., Cecconi, F., & Di Bartolomeo, S. (2015). Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Molecular Oncology*, *9*(8), 1612-1625. https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.04.016

Chan, E. Y. W., Kir, S., & Tooze, S. A. (2007). siRNA Screening of the Kinome Identifies ULK1 as a Multidomain Modulator of Autophagy*. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(35), 25464-25474. https://doi.org/10.1074/jbc.M703663200

Chan, E. Y. W., Longatti, A., McKnight, N. C., & Tooze, S. A. (2009). Kinase-Inactivated ULK Proteins Inhibit Autophagy via Their Conserved C-Terminal Domains Using an Atg13-Independent Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*, *29*(1), 157-171. https://doi.org/10.1128/MCB.01082-08

Chan, S. Y., Zhang, Y.-Y., Hemann, C., Mahoney, C. E., Zweier, J. L., & Loscalzo, J. (2009). MicroRNA-210 Controls Mitochondrial Metabolism during Hypoxia by Repressing the Iron-Sulfur Cluster Assembly Proteins ISCU1/2. *Cell metabolism*, *10*(4), 273-284. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.08.015

Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M., & Schumacker, P. T. (2000). Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1α during Hypoxia : A MECHANISM OF O2 SENSING *. *Journal of Biological Chemistry*, *275*(33), 25130-25138. https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200

Chang, H.-A., Ou Yang, R.-Z., Su, J.-M., Nguyen, T. M. H., Sung, J.-M., Tang, M.-J., & Chiu, W.-T. (2023). YAP nuclear translocation induced by HIF-1α prevents DNA damage under hypoxic conditions. *Cell Death Discovery*, *9*, 385. https://doi.org/10.1038/s41420-023-01687-5

Chang, H.-Y., & Yang, W. Y. (2022). Golgi quality control and autophagy. *IUBMB Life*, *74*(4), 361-370. https://doi.org/10.1002/iub.2611

Chang, Y.-C., Wu, J.-W., Hsieh, Y.-C., Huang, T.-H., Liao, Z.-M., Huang, Y.-S., Mondo, J. A., Montell, D., & Jang, A. C.-C. (2018). Rap1 Negatively Regulates the Hippo Pathway to Polarize Directional Protrusions in Collective Cell Migration. *Cell reports*, *22*(8), 2160-2175. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.080

Chang, Y.-C., Wu, J.-W., Wang, C.-W., & Jang, A. C.-C. (2020). Hippo Signaling-Mediated Mechanotransduction in Cell Movement and Cancer Metastasis. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *6*, 157. https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00157

Chauhan, S., Goodwin, J. G., Chauhan, S., Manyam, G., Wang, J., Kamat, A. M., & Boyd, D. D. (2013). ZKSCAN3 is a master transcriptional repressor of autophagy. *Molecular Cell*, *50*(1), 16-28. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.024

Chen, C., Guo, Q., Liu, Y., Hou, Q., Liao, M., Guo, Y., Zang, Y., Wang, F., Liu, H., Luan, X., Liang, Y., Guan, Z., Li, Y., Liu, H., Dong, X., Zhang, X., Liu, J., & Xu, Q. (2023). Single-cell and spatial transcriptomics reveal POSTN+ cancer-associated fibroblasts correlated with immune suppression and tumour progression in non-small cell lung cancer. *Clinical and Translational Medicine*, *13*(12), e1515. https://doi.org/10.1002/ctm2.1515

Chen, C., Pore, N., Behrooz, A., Ismail-Beigi, F., & Maity, A. (2001). Regulation of *glut1* mRNA by Hypoxia-inducible Factor-1. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(12), 9519-9525. https://doi.org/10.1074/jbc.M010144200

Chen, N., & and Debnath, J. (2013). IκB kinase complex (IKK) triggers detachment-induced autophagy in mammary epithelial cells independently of the PI3K-AKT-MTORC1 pathway. *Autophagy*, *9*(8), 1214-1227. https://doi.org/10.4161/auto.24870

Chen, Q., Boire, A., Jin, X., Valiente, M., Er, E. E., Lopez-Soto, A., S. Jacob, L., Patwa, R., Shah, H., Xu, K., Cross, J. R., & Massagué, J. (2016). Carcinoma–astrocyte gap junctions promote brain metastasis by cGAMP transfer. *Nature*, *533*(7604), 493-498. https://doi.org/10.1038/nature18268

Chen, Q., Ye, L., Fan, J., Zhang, X., Wang, H., Liao, S., Song, P., Wang, Z., Wang, S., Li, Y., Luan, J., Wang, Y., Chen, W., Zai, W., Yang, P., Cao, Z., & Ju, D. (2017). Autophagy suppression potentiates the anti-glioblastoma effect of asparaginase in vitro and in vivo. *Oncotarget*, *8*(53), 91052-91066. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19409

Chen, S., Jiang, Y.-Z., Huang, L., Zhou, R.-J., Yu, K.-D., Liu, Y., & Shao, Z.-M. (2013). The residual tumor autophagy marker LC3B serves as a prognostic marker in local advanced breast cancer after neoadjuvant chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *19*(24), 6853-6862. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1617

Chen, S., Jing, Y., Kang, X., Yang, L., Wang, D.-L., Zhang, W., Zhang, L., Chen, P., Chang, J.-F., Yang, X.-M., & Sun, F.-L. (2017). Histone H2B monoubiquitination is a critical epigenetic switch for the regulation of autophagy. *Nucleic Acids Research*, *45*(3), 1144-1158. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1025

Chen, T., Ashwood, L. M., Kondrashova, O., Strasser, A., Kelly, G., & Sutherland, K. D. (2025). Breathing new insights into the role of mutant p53 in lung cancer. *Oncogene*, *44*(3), 115-129. https://doi.org/10.1038/s41388-024-03219-6

Chen, Y., Zhou, X., Qiao, J., & Bao, A. (2017). MiR-142-3p Overexpression Increases Chemo-Sensitivity of NSCLC by Inhibiting HMGB1-Mediated Autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *41*(4), 1370-1382. https://doi.org/10.1159/000467896

Chen, Z., Han, F., Du, Y., Shi, H., & Zhou, W. (2023). Hypoxic microenvironment in cancer : Molecular mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*, 70. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01332-8

Chen, Z., Xiong, H., Shen, H., & You, Q. (2022). Autophagy characteristics and establishment of autophagy prognostic models in lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma. *PLoS ONE*, *17*(3), e0266070. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266070

Chen, Z., Zhang, N., Chu, H. Y., Yu, Y., Zhang, Z.-K., Zhang, G., & Zhang, B.-T. (2020). Connective Tissue Growth Factor : From Molecular Understandings to Drug Discovery. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 593269. https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593269

Cheng, Y., Hou, W., Fang, H., Yan, Y., Lu, Y., Meng, T., Ma, C., Liu, Q., Zhou, Z., Li, H., Li, H., & Xiao, N. (2024). SENP2-NDR2-p21 axis modulates lung cancer cell growth. *European Journal of Pharmacology*, *978*, 176761. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2024.176761

Cheong, H. I., Asosingh, K., Stephens, O. R., Queisser, K. A., Xu, W., Willard, B., Hu, B., Dermawan, J. K. T., Stark, G. R., Naga Prasad, S. V., & Erzurum, S. C. (s. d.). Hypoxia sensing through β-adrenergic receptors. *JCI Insight*, *1*(21), e90240. https://doi.org/10.1172/jci.insight.90240

Cheung, K. J., & Ewald, A. J. (2016). A collective route to metastasis : Seeding by tumor cell clusters. *Science (New York, N.Y.)*, *352*(6282), 167-169. https://doi.org/10.1126/science.aaf6546

Cheung, K. J., Gabrielson, E., Werb, Z., & Ewald, A. J. (2013). Collective Invasion in Breast Cancer Requires a Conserved Basal Epithelial Program. *Cell*, *155*(7), 1639-1651. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.029

Chiang, H. L., & Dice, J. F. (1988). Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(14), 6797-6805.

Chiduza, G. N., Garza-Garcia, A., Almacellas, E., De Tito, S., Pye, V. E., van Vliet, A. R., Cherepanov, P., & Tooze, S. A. (2024). ATG9B is a tissue-specific homotrimeric lipid scramblase that can compensate for ATG9A. *Autophagy*, *20*(3), 557-576. https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2275905

Cho, C.-Y., Lee, K.-T., Chen, W.-C., Wang, C.-Y., Chang, Y.-S., Huang, H.-L., Hsu, H.-P., Yen, M.-C., Lai, M.-Z., & Lai, M.-D. (2016). MST3 promotes proliferation and tumorigenicity through the VAV2/Rac1 signal axis in breast cancer. *Oncotarget*, *7*(12), 14586-14604. https://doi.org/10.18632/oncotarget.7542

Choi, J., Jang, H., Xuan, Z., & Park, D. (2024). Emerging roles of ATG9/ATG9A in autophagy : Implications for cell and neurobiology. *Autophagy*. https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15548627.2024.2384349

Choi, J. Y., Jang, Y. S., Min, S. Y., & Song, J. Y. (2011). Overexpression of MMP-9 and HIF-1α in Breast Cancer Cells under Hypoxic Conditions. *Journal of Breast Cancer*, *14*(2), 88-95. https://doi.org/10.4048/jbc.2011.14.2.88

Chouaib, S., Noman, M., Kosmatopoulos, K., & Curran, M. (2017). Hypoxic stress : Obstacles and opportunities for innovative immunotherapy of cancer. *Oncogene*, *36*(4), 439-445. https://doi.org/10.1038/onc.2016.225

Chow, C., Wong, N., Pagano, M., Lun, S. W.-M., Nakayama, K.-I., Nakayama, K., & Lo, K.-W. (2012). Regulation of APC/CCdc20 activity by RASSF1A–APC/CCdc20 circuitry. *Oncogene*, *31*(15), 1975-1987. https://doi.org/10.1038/onc.2011.372

Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA Damage Response : Making it safe to play with knives. *Molecular cell*, *40*(2), 179-204. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019

Claude-Taupin, A., Isnard, P., Bagattin, A., Kuperwasser, N., Roccio, F., Ruscica, B., Goudin, N., Garfa-Traoré, M., Regnier, A., Turinsky, L., Burtin, M., Foretz, M., Pontoglio, M., Morel, E., Viollet, B., Terzi, F., Codogno, P., & Dupont, N. (2023). The AMPK-Sirtuin 1-YAP axis is regulated by fluid

flow intensity and controls autophagy flux in kidney epithelial cells. *Nature Communications*, *14*(1), 8056. https://doi.org/10.1038/s41467-023-43775-1

Colaco, R. J., Martin, P., Kluger, H. M., Yu, J. B., & Chiang, V. L. (2016). Does immunotherapy increase the rate of radiation necrosis after radiosurgical treatment of brain metastases? *Journal of Neurosurgery*, *125*(1), 17-23. https://doi.org/10.3171/2015.6.JNS142763

Contreras, A. U., Mebratu, Y., Delgado, M., Montano, G., Hu, C. A., Ryter, S. W., Choi, A. M. K., Lin, Y., Xiang, J., Chand, H., & Tesfaigzi, Y. (2013). Deacetylation of p53 induces autophagy by suppressing Bmf expression. *Journal of Cell Biology*, *201*(3), 427-437. https://doi.org/10.1083/jcb.201205064

Corcelle-Termeau, E., Vindeløv, S. D., Hämälistö, S., Mograbi, B., Keldsbo, A., Bräsen, J. H., Favaro, E., Adam, D., Szyniarowski, P., Hofman, P., Krautwald, S., Farkas, T., Petersen, N. H. T., Rohde, M., Linkermann, A., & Jäättelä, M. (2016). Excess sphingomyelin disturbs ATG9A trafficking and autophagosome closure. *Autophagy*, *12*(5), 833-849. https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1159378

Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A. R., Poletti, A., Daidone, M. G., Dupont, S., Basso, G., Bicciato, S., & Piccolo, S. (2011). The Hippo Transducer TAZ Confers Cancer Stem Cell-Related Traits on Breast Cancer Cells. *Cell*, *147*(4), 759-772. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.048

Cornils, H., Kohler, R. S., Hergovich, A., & Hemmings, B. A. (2011). Human NDR Kinases Control G1/S Cell Cycle Transition by Directly Regulating p21 Stability ▿. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(7), 1382-1395. https://doi.org/10.1128/MCB.01216-10

Corrales, L., Scilla, K., Caglevic, C., Miller, K., Oliveira, J., & Rolfo, C. (2018). Immunotherapy in Lung Cancer : A New Age in Cancer Treatment. In A. Naing & J. Hajjar (Éds.), *Immunotherapy* (p. 65-95). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-02505-2_3

Costello, C. M., McCullagh, B., Howell, K., Sands, M., Belperio, J. A., Keane, M. P., Gaine, S., & McLoughlin, P. (2012). A role for the CXCL12 receptor, CXCR7, in the pathogenesis of human pulmonary vascular disease. *The European Respiratory Journal*, *39*(6), 1415-1424. https://doi.org/10.1183/09031936.00044911

Couraud, P. S. (2025). *Référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique*.

Courtnay, R., Ngo, D. C., Malik, N., Ververis, K., Tortorella, S. M., & Karagiannis, T. C. (2015). Cancer metabolism and the Warburg effect : The role of HIF-1 and PI3K. *Molecular Biology Reports*, *42*(4), 841-851. https://doi.org/10.1007/s11033-015-3858-x

Cuervo, A. M., & Dice, J. F. (2000). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *Journal of Cell Science*, *113 Pt 24*, 4441-4450. https://doi.org/10.1242/jcs.113.24.4441

Cufí, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Martin-Castillo, B., Vellon, L., & Menendez, J. A. (2011). Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *10*(22), 3871-3885. https://doi.org/10.4161/cc.10.22.17976

Dabral, S., Muecke, C., Valasarajan, C., Schmoranzer, M., Wietelmann, A., Semenza, G. L., Meister, M., Muley, T., Seeger-Nukpezah, T., Samakovlis, C., Weissmann, N., Grimminger, F., Seeger, W., Savai, R., & Pullamsetti, S. S. (2019). A RASSF1A-HIF1α loop drives Warburg effect in cancer and pulmonary hypertension. *Nature Communications*, *10*(1), 2130. https://doi.org/10.1038/s41467-019-10044-z

Dachs, G. U., Dougherty, G. J., Stratford, I. J., & Chaplin, D. J. (1997). Targeting gene therapy to cancer : A review. *Oncology Research*, *9*(6-7), 313-325.

Dai, Y., Zhang, X., Ou, Y., Zou, L., Zhang, D., Yang, Q., Qin, Y., Du, X., Li, W., Yuan, Z., Xiao, Z., & Wen, Q. (2023). Anoikis resistance—protagonists of breast cancer cells survive and metastasize after ECM detachment. *Cell Communication and Signaling : CCS*, *21*, 190. https://doi.org/10.1186/s12964-023-01183-4

Dallol, A., Cooper, W. N., Al-Mulla, F., Agathanggelou, A., Maher, E. R., & Latif, F. (2007). Depletion of the Ras Association Domain Family 1, Isoform A–Associated Novel Microtubule-Associated Protein, C19ORF5/MAP1S, Causes Mitotic Abnormalities. *Cancer Research*, *67*(2), 492-500. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3604

Dang, T. T., Kim, M.-J., Lee, Y. Y., Le, H. T., Kim, K. H., Nam, S., Hyun, S. H., Kim, H. L., Chung, S. W., Chung, H. T., Jho, E.-H., Yoshida, H., Kim, K., Park, C. Y., Lee, M.-S., & Back, S. H. (2023). Phosphorylation of EIF2S1 (eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) is indispensable for nuclear translocation of TFEB and TFE3 during ER stress. *Autophagy*, *19*(7), 2111-2142. https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2173900

Das, B., Pal, B., Bhuyan, R., Li, H., Sarma, A., Gayan, S., Talukdar, J., Sandhya, S., Bhuyan, S., Gogoi, G., Gouw, A. M., Baishya, D., Gotlib, J. R., Kataki, A. C., & Felsher, D. W. (2019). MYC regulates the HIF-2α stemness pathway via Nanog and Sox2 to maintain self-renewal in cancer stem cells versus non-stem cancer cells. *Cancer research*, *79*(16), 4015-4025. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2847

Datta, S., Choudhury, D., Das, A., Mukherjee, D. D., Dasgupta, M., Bandopadhyay, S., & Chakrabarti, G. (2019). Autophagy inhibition with chloroquine reverts paclitaxel resistance and attenuates metastatic potential in human nonsmall lung adenocarcinoma A549 cells via ROS mediated modulation of β-catenin pathway. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, *24*(5-6), 414-433. https://doi.org/10.1007/s10495-019-01526-y

Daud, A. I., Wolchok, J. D., Robert, C., Hwu, W.-J., Weber, J. S., Ribas, A., Hodi, F. S., Joshua, A. M., Kefford, R., Hersey, P., Joseph, R., Gangadhar, T. C., Dronca, R., Patnaik, A., Zarour, H., Roach, C., Toland, G., Lunceford, J. K., Li, X. N., … Hamid, O. (2016). Programmed Death-Ligand 1 Expression and Response to the Anti-Programmed Death 1 Antibody Pembrolizumab in Melanoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *34*(34), 4102-4109. https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.2477

Davies, A. K., Itzhak, D. N., Edgar, J. R., Archuleta, T. L., Hirst, J., Jackson, L. P., Robinson, M. S., & Borner, G. H. H. (2018). AP-4 vesicles contribute to spatial control of autophagy via RUSC-dependent peripheral delivery of ATG9A. *Nature Communications*, *9*, 3958. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06172-7

Dayan, F., Roux, D., Brahimi-Horn, M. C., Pouyssegur, J., & Mazure, N. M. (2006). The Oxygen Sensor Factor-Inhibiting Hypoxia-Inducible Factor-1 Controls Expression of Distinct Genes through the Bifunctional Transcriptional Character of Hypoxia-Inducible Factor-1α. *Cancer Research*, *66*(7), 3688-3698. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4564

De Bock, K., Mazzone, M., & Carmeliet, P. (2011). Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis : Risky liaisons, or not? *Nature Reviews Clinical Oncology*, *8*(7), 393-404. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.83

De Tito, S., Hervás, J. H., van Vliet, A. R., & Tooze, S. A. (2020). The Golgi as an Assembly Line to the Autophagosome. *Trends in Biochemical Sciences*, *45*(6), 484-496. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.03.010

DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. (2008). The biology of cancer : Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metabolism*, *7*(1), 11-20. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002

Debnath, J., Gammoh, N., & Ryan, K. M. (2023). Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1-16. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00585-z

de Fraipont, F., Levallet, G., Creveuil, C., Bergot, E., Beau-Faller, M., Mounawar, M., Richard, N., Antoine, M., Rouquette, I., Favrot, M.-C., Debieuvre, D., Braun, D., Westeel, V., Quoix, E., Brambilla, E., Hainaut, P., Moro-Sibilot, D., Morin, F., Milleron, B., … Thoracique (IFCT), on behalf of the I. F. de C. (2012). An Apoptosis Methylation Prognostic Signature for Early Lung Cancer in the IFCT-0002 Trial. *Clinical Cancer Research*, *18*(10), 2976-2986. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2797

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S., & White, E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell*, *10*(1), 51-64. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001

Della Rocca, Y., Fonticoli, L., Rajan, T. S., Trubiani, O., Caputi, S., Diomede, F., Pizzicannella, J., & Marconi, G. D. (2022). Hypoxia : Molecular pathophysiological mechanisms in human diseases. *Journal of Physiology and Biochemistry*, *78*(4), 739-752. https://doi.org/10.1007/s13105-022-00912-6

Demeter, A., Romero-Mulero, M. C., Csabai, L., Ölbei, M., Sudhakar, P., Haerty, W., & Korcsmáros, T. (2020). ULK1 and ULK2 are less redundant than previously thought : Computational analysis uncovers distinct regulation and functions of these autophagy induction proteins. *Scientific Reports*, *10*(1), 10940. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67780-2

DeRan, M., Yang, J., Shen, C.-H., Peters, E. C., Fitamant, J., Chan, P., Hsieh, M., Zhu, S., Asara, J. M., Zheng, B., Bardeesy, N., Liu, J., & Wu, X. (2014). Energy Stress Regulates Hippo–YAP Signaling involving AMPK-mediated Regulation of Angiomotin Like-1 Protein. *Cell reports*, *9*(2), 495-503. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.036

de Visser, K. E., Eichten, A., & Coussens, L. M. (2006). Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews. Cancer*, *6*(1), 24-37. https://doi.org/10.1038/nrc1782

de Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment : From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell*, *41*(3), 374-403. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016

Dewhirst, M. W., Ong, E. T., Braun, R. D., Smith, B., Klitzman, B., Evans, S. M., & Wilson, D. (1999). Quantification of longitudinal tissue pO2 gradients in window chamber tumours : Impact on tumour hypoxia. *British Journal of Cancer*, *79*(11-12), 1717-1722. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690273

Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., D'Amelio, M., Nardacci, R., Romagnoli, A., Piacentini, M., Cecconi, F., & Fimia, G. M. (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *Journal of Cell Biology*, *191*(1), 155-168. https://doi.org/10.1083/jcb.201002100

Dice, J. F. (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, *15*(8), 305-309. https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8

Dice, J. F. (2007). Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy*, *3*(4), 295-299. https://doi.org/10.4161/auto.4144

D'Ignazio, L., Batie, M., & Rocha, S. (2017). Hypoxia and Inflammation in Cancer, Focus on HIF and NF-κB. *Biomedicines*, *5*(2), 21. https://doi.org/10.3390/biomedicines5020021

Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *19*(6), 349-364. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4

Ding, X., Wang, L., Zhang, X., Xu, J., Li, P., Liang, H., Zhang, X., Xie, L., Zhou, Z., Yang, J., Weichselbaum, R. R., Yu, J., & Hu, M. (2021). The relationship between expression of PD-L1 and HIF-1α in glioma cells under hypoxia. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*, 92. https://doi.org/10.1186/s13045-021-01102-5

Dong, J., Feldmann, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S. A., Gayyed, M. F., Anders, R. A., Maitra, A., & Pan, D. (2007). Elucidation of a Universal Size-Control Mechanism in Drosophila and Mammals. *Cell*, *130*(6), 1120-1133. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.019

Dong, L., Sun, L., Zhang, X., Pan, L., Lian, L., Chen, Z., & Zhong, D. (2013). Negative regulation of mTOR activity by LKB1-AMPK signaling in non-small cell lung cancer cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, *34*(2), 314-318. https://doi.org/10.1038/aps.2012.143

Dong, W., Chen, Y., Qian, N., Sima, G., Zhang, J., Guo, Z., & Wang, C. (2020). SATB2 knockdown decreases hypoxia-induced autophagy and stemness in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*, *20*(1), 794-802. https://doi.org/10.3892/ol.2020.11589

Donninger, H., Clark, J. A., Monaghan, M. K., Schmidt, M. L., Vos, M., & Clark, G. J. (2014). Cell Cycle Restriction Is More Important Than Apoptosis Induction for RASSF1A Protein Tumor Suppression*. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(45), 31287-31295. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.609537

Dooley, H. C., Razi, M., Polson, H. E. J., Girardin, S. E., Wilson, M. I., & Tooze, S. A. (2014). WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5-16L1. *Molecular Cell*, *55*(2), 238-252. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.05.021

Doron, H., Amer, M., Ershaid, N., Blazquez, R., Shani, O., Lahav, T. G., Cohen, N., Adler, O., Hakim, Z., Pozzi, S., Scomparin, A., Cohen, J., Yassin, M., Monteran, L., Grossman, R., Tsarfaty, G., Luxenburg, C., Satchi-Fainaro, R., Pukrop, T., & Erez, N. (2019). Inflammatory Activation of Astrocytes Facilitates Melanoma Brain Tropism via the CXCL10-CXCR3 Signaling Axis. *Cell Reports*, *28*(7), 1785-1798.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.033

Drilon, A. E., Filleron, T., Bergagnini, I., Milia, J., Hatzoglou, V., Velcheti, V., Besse, B., Mok, T., Awad, M. M., Wolf, J., Carbone, D. P., Camidge, D. R., Riely, G. J., Peled, N., Mazieres, J., Kris, M. G., Gautschi, O., & Global Multicenter RET Registry Investigators. (2017). Baseline frequency of brain metastases and outcomes with multikinase inhibitor therapy in patients with RET-rearranged lung cancers. *Journal of Clinical Oncology*, *35*(15_suppl), 9069-9069. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9069

Drilon, A., Siena, S., Dziadziuszko, R., Barlesi, F., Krebs, M. G., Shaw, A. T., de Braud, F., Rolfo, C., Ahn, M.-J., Wolf, J., Seto, T., Cho, B. C., Patel, M. R., Chiu, C.-H., John, T., Goto, K., Karapetis, C. S., Arkenau, H.-T., Kim, S.-W., … trial investigators. (2020). Entrectinib in ROS1 fusion-positive non-small-cell lung cancer : Integrated analysis of three phase 1-2 trials. *The Lancet. Oncology*, *21*(2), 261-270. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30690-4

Driscoll, T. P., Cosgrove, B. D., Heo, S.-J., Shurden, Z. E., & Mauck, R. L. (2015). Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophysical Journal*, *108*(12), 2783-2793. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.05.010

Du, H., Chen, L., Luo, F., Chen, X., Li, Y., & Cheng, Q. (2020). Beclin-1 expression is associated with prognosis in a Bcl-2-dependent manner in non-small cell lung cancer. *Oncology Letters*, *20*(4), 9. https://doi.org/10.3892/ol.2020.11870

Du, X., Shao, Y., Qin, H., Tai, Y., & Gao, H. (2018). ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC). *Thoracic Cancer*, *9*(4), 423-430. https://doi.org/10.1111/1759-7714.12613

Dubois, F., Bergot, E., Zalcman, G., & Levallet, G. (2019). RASSF1A, puppeteer of cellular homeostasis, fights tumorigenesis, and metastasis—An updated review. *Cell Death & Disease*, *10*(12), 1-13. https://doi.org/10.1038/s41419-019-2169-x

Dubois, F., Keller, M., Calvayrac, O., Soncin, F., Hoa, L., Hergovich, A., Parrini, M.-C., Mazières, J., Vaisse-Lesteven, M., Camonis, J., Levallet, G., & Zalcman, G. (2016). RASSF1A Suppresses the Invasion and Metastatic Potential of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Inhibiting YAP Activation through the GEF-H1/RhoB Pathway. *Cancer Research*, *76*(6), 1627-1640. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1008

Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, *474*(7350), 179-183. https://doi.org/10.1038/nature10137

Egan, D., Kim, J., Shaw, R. J., & Guan, K.-L. (2011). The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy*, *7*(6), 643-644. https://doi.org/10.4161/auto.7.6.15123

Elkhatib, N., Neu, M. B., Zensen, C., Schmoller, K. M., Louvard, D., Bausch, A. R., Betz, T., & Vignjevic, D. M. (2014). Fascin plays a role in stress fiber organization and focal adhesion disassembly. *Current Biology: CB*, *24*(13), 1492-1499. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.023

Errafiy, R., Aguado, C., Ghislat, G., Esteve, J. M., Gil, A., Loutfi, M., & Knecht, E. (2013). PTEN increases autophagy and inhibits the ubiquitin-proteasome pathway in glioma cells independently of its lipid phosphatase activity. *PloS One*, *8*(12), e83318. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083318

Ervin, E.-H., French, R., Chang, C.-H., & Pauklin, S. (2022). Inside the stemness engine : Mechanistic links between deregulated transcription factors and stemness in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, *87*, 48-83. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.11.001

Eskelinen, E.-L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*, *27*(5-6), 495-502. https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.08.005

Eskelinen, E.-L. (2019). Autophagy : Supporting cellular and organismal homeostasis by self-eating. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *111*, 1-10. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.03.010

Fang, J. S., Gillies, R. D., & Gatenby, R. A. (2008). Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in cancer biology*, *18*(5), 330-337. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.011

Feng, J., Ouyang, H., Wang, J., Pan, D., Sheng, L., Xu, C., Lin, W., Hu, D., Chang, C., & Jia, D. (2022). MPZL1 upregulation promotes tumor metastasis and correlates with unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, *43*(10), 919-929. https://doi.org/10.1093/carcin/bgac055

Feng, X., Degese, M. S., Iglesias-Bartolome, R., Vaque, J. P., Molinolo, A. A., Rodrigues, M., Zaidi, M. R., Ksander, B. R., Merlino, G., Sodhi, A., Chen, Q., & Gutkind, J. S. (2014). Hippo-Independent Activation of YAP by the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene through a Trio-regulated Rho

GTPase Signaling Circuitry. *Cancer cell*, *25*(6), 831-845. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.04.016

Fesenko, M., Moore, D. J., Ewbank, P., Courthold, E., & Royle, S. J. (2025). ATG9A vesicles are a subtype of intracellular nanovesicle. *Journal of Cell Science*, *138*(7), jcs263852. https://doi.org/10.1242/jcs.263852

Finlay, D. K., Rosenzweig, E., Sinclair, L. V., Feijoo-Carnero, C., Hukelmann, J. L., Rolf, J., Panteleyev, A. A., Okkenhaug, K., & Cantrell, D. A. (2012). PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(13), 2441-2453. https://doi.org/10.1084/jem.20112607

Flower, T. G., Takahashi, Y., Hudait, A., Rose, K., Tjahjono, N., Pak, A. J., Yokom, A. L., Liang, X., Wang, H.-G., Bouamr, F., Voth, G. A., & Hurley, J. H. (2020). A helical assembly of human ESCRT-I scaffolds reverse-topology membrane scission. *Nature structural & molecular biology*, *27*(6), 570-580. https://doi.org/10.1038/s41594-020-0426-4

Folarin, A. A., Konerding, M. A., Timonen, J., Nagl, S., & Pedley, R. B. (2010). THREE-DIMENSIONAL ANALYSIS OF TUMOUR VASCULAR CORROSION CASTS USING STEREOIMAGING AND MICRO-COMPUTED TOMOGRAPHY. *Microvascular research*, *80*(1), 89-98. https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.03.007

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis : Therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, *285*(21), 1182-1186. https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108

Forder, A., Hsing, C.-Y., Trejo Vazquez, J., & Garnis, C. (2021). Emerging Role of Extracellular Vesicles and Cellular Communication in Metastasis. *Cells*, *10*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/cells10123429

Friedberg, E. C., Aguilera, A., Gellert, M., Hanawalt, P. C., Hays, J. B., Lehmann, A. R., Lindahl, T., Lowndes, N., Sarasin, A., & Wood, R. D. (2006). DNA repair : From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair*, *5*(8), 986-996. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.05.005

Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(5), 2092-2100. https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1257

Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C. V., & Semenza, G. L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell*, *129*(1), 111-122. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.047

Füllgrabe, J., Klionsky, D. J., & Joseph, B. (2014). The return of the nucleus : Transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(1), 65-74. https://doi.org/10.1038/nrm3716

Füllgrabe, J., Lynch-Day, M. A., Heldring, N., Li, W., Struijk, R. B., Ma, Q., Hermanson, O., Rosenfeld, M. G., Klionsky, D. J., & Joseph, B. (2013). The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. *Nature*, *500*(7463), 468-471. https://doi.org/10.1038/nature12313

Fung, C., Lock, R., Gao, S., Salas, E., & Debnath, J. (2008). Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(3), 797-806. https://doi.org/10.1091/mbc.E07-10-1092

Fuqua, J. D., Mere, C. P., Kronemberger, A., Blomme, J., Bae, D., Turner, K. D., Harris, M. P., Scudese, E., Edwards, M., Ebert, S. M., de Sousa, L. G. O., Bodine, S. C., Yang, L., Adams, C. M., & Lira, V. A. (2019). ULK2 is essential for degradation of ubiquitinated protein aggregates and homeostasis in skeletal muscle. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of*

*American Societies for Experimental Biology*, *33*(11), 11735-11745. https://doi.org/10.1096/fj.201900766R

Galavotti, S., Bartesaghi, S., Faccenda, D., Shaked-Rabi, M., Sanzone, S., McEvoy, A., Dinsdale, D., Condorelli, F., Brandner, S., Campanella, M., Grose, R., Jones, C., & Salomoni, P. (2013). The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. *Oncogene*, *32*(6), 699-712. https://doi.org/10.1038/onc.2012.111

Gan, W., Dai, X., Dai, X., Xie, J., Yin, S., Zhu, J., Wang, C., Liu, Y., Guo, J., Wang, M., Liu, J., Hu, J., Quinton, R. J., Ganem, N. J., Liu, P., Asara, J. M., Pandolfi, P. P., Yang, Y., He, Z., … Wei, W. (2020). LATS suppresses mTORC1 activity to directly coordinate Hippo and mTORC1 pathways in growth control. *Nature cell biology*, *22*(2), 246-256. https://doi.org/10.1038/s41556-020-0463-6

Ganley, I. G., Lam, D. H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., & Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(18), 12297-12305. https://doi.org/10.1074/jbc.M900573200

Gao, F., Okunieff, P., Han, Z., Ding, I., Wang, L., Liu, W., Zhang, J., Yang, S., Chen, J., Underhill, C. B., Kim, S., & Zhang, L. (2005). Hypoxia-induced alterations in hyaluronan and hyaluronidase. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *566*, 249-256. https://doi.org/10.1007/0-387-26206-7_33

Gao, X., Lian, Q., Guan, B., Liu, Q.-Y., Meng, M., Chen, Y., Jin, J., Li, H., Liu, X., Sun, Z., Liu, L., He, Q.-Y., & Zhang, G. (2023). ZSWIM1 Promotes the Proliferation and Metastasis of Lung Adenocarcinoma Cells through the STK38/MEKK2/ERK1/2 Axis. *Journal of Proteome Research*, *22*(4), 1080-1091. https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00412

Gao, X.-Z., Wang, G.-N., Zhao, W.-G., Han, J., Diao, C.-Y., Wang, X.-H., Li, S.-L., & Li, W.-C. (2019). Blocking OLFM4/HIF-1α axis alleviates hypoxia-induced invasion, epithelial–mesenchymal transition, and chemotherapy resistance in non-small-cell lung cancer. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(9), 15035-15043. https://doi.org/10.1002/jcp.28144

Gavert, N., & Ben-Ze'ev, A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition and the invasive potential of tumors. *Trends in Molecular Medicine*, *14*(5), 199-209. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.03.004

Gawrzak, S., Rinaldi, L., Gregorio, S., Arenas, E. J., Salvador, F., Urosevic, J., Figueras-Puig, C., Rojo, F., Del Barco Barrantes, I., Cejalvo, J. M., Palafox, M., Guiu, M., Berenguer-Llergo, A., Symeonidi, A., Bellmunt, A., Kalafatovic, D., Arnal-Estapé, A., Fernández, E., Müllauer, B., … Gomis, R. R. (2018). MSK1 regulates luminal cell differentiation and metastatic dormancy in ER+ breast cancer. *Nature Cell Biology*, *20*(2), 211-221. https://doi.org/10.1038/s41556-017-0021-z

Ge, L., Melville, D., Zhang, M., & Schekman, R. (2013). The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife*, *2*, e00947. https://doi.org/10.7554/eLife.00947

Geissler, M., Jia, W., Kiraz, E. N., Kulacz, I., Liu, X., Rombach, A., Prinz, V., Jussen, D., Kokkaliaris, K. D., Medyouf, H., Sevenich, L., Czabanka, M., & Broggini, T. (2023). The Brain Pre-Metastatic Niche : Biological and Technical Advancements. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(12), 10055. https://doi.org/10.3390/ijms241210055

Gerald, D., Berra, E., Frapart, Y. M., Chan, D. A., Giaccia, A. J., Mansuy, D., Pouysségur, J., Yaniv, M., & Mechta-Grigoriou, F. (2004). JunD Reduces Tumor Angiogenesis by Protecting Cells from Oxidative Stress. *Cell*, *118*(6), 781-794. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.025

Giam, M., & Rancati, G. (2015). Aneuploidy and chromosomal instability in cancer : A jackpot to chaos. *Cell Division*, *10*, 3. https://doi.org/10.1186/s13008-015-0009-7

Giatromanolaki, A., Koukourakis, I. M., Balaska, K., Mitrakas, A. G., Harris, A. L., & Koukourakis, M. I. (2019). Programmed death-1 receptor (PD-1) and PD-ligand-1 (PD-L1) expression in non-small cell lung cancer and the immune-suppressive effect of anaerobic glycolysis. *Medical Oncology*, *36*(9), 76. https://doi.org/10.1007/s12032-019-1299-4

Gilkes, D. M., Semenza, G. L., & Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix : Drivers of tumour metastasis. *Nature reviews. Cancer*, *14*(6), 430-439. https://doi.org/10.1038/nrc3726

Gill, R. K., Yang, S.-H., Meerzaman, D., Mechanic, L. E., Bowman, E. D., Jeon, H.-S., Roy Chowdhuri, S., Shakoori, A., Dracheva, T., Hong, K.-M., Fukuoka, J., Zhang, J.-H., Harris, C. C., & Jen, J. (2011). Frequent homozygous deletion of the LKB1/STK11 gene in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, *30*(35), 3784-3791. https://doi.org/10.1038/onc.2011.98

Gkountakos, A., Sartori, G., Falcone, I., Piro, G., Ciuffreda, L., Carbone, C., Tortora, G., Scarpa, A., Bria, E., Milella, M., Rosell, R., Corbo, V., & Pilotto, S. (2019). PTEN in Lung Cancer : Dealing with the Problem, Building on New Knowledge and Turning the Game Around. *Cancers*, *11*(8), 1141. https://doi.org/10.3390/cancers11081141

Gong, C., Bauvy, C., Tonelli, G., Yue, W., Deloménie, C., Nicolas, V., Zhu, Y., Domergue, V., Marin-Esteban, V., Tharinger, H., Delbos, L., Gary-Gouy, H., Morel, A.-P., Ghavami, S., Song, E., Codogno, P., & Mehrpour, M. (2013). Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene*, *32*(18), 2261-2272, 2272e.1-11. https://doi.org/10.1038/onc.2012.252

Gong, R., Hong, A. W., Plouffe, S. W., Zhao, B., Liu, G., Yu, F.-X., Xu, Y., & Guan, K.-L. (2015). Opposing roles of conventional and novel PKC isoforms in Hippo-YAP pathway regulation. *Cell Research*, *25*(8), 985-988. https://doi.org/10.1038/cr.2015.88

Gordan, J. D., Thompson, C. B., & Simon, M. C. (2007). HIF and c-Myc : Sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer cell*, *12*(2), 108-113. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.07.006

Grant, G., & Ferrer, C. M. (2025). The role of the immune tumor microenvironment in shaping metastatic dissemination, dormancy, and outgrowth. *Trends in Cell Biology*. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2025.05.006

Gray, L. H., Conger, A. D., Ebert, M., Hornsey, S., & Scott, O. C. A. (1953). The Concentration of Oxygen Dissolved in Tissues at the Time of Irradiation as a Factor in Radiotherapy. *British Journal of Radiology*, *26*(312), 638-648. https://doi.org/10.1259/0007-1285-26-312-638

Greenhough, A., Bagley, C., Heesom, K. J., Gurevich, D. B., Gay, D., Bond, M., Collard, T. J., Paraskeva, C., Martin, P., Sansom, O. J., Malik, K., & Williams, A. C. (2018). Cancer cell adaptation to hypoxia involves a HIF-GPRC5A-YAP axis. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(11), e8699. https://doi.org/10.15252/emmm.201708699

Gridley, T. (2001). Notch signaling during vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(10), 5377-5378. https://doi.org/10.1073/pnas.101138098

Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, *140*(6), 883-899. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025

Gu, J., Yang, S., Wang, X., Wu, Y., Wei, J., & Xu, J. (2023). Hypoxic lung adenocarcinoma-derived exosomal miR-1290 induces M2 macrophage polarization by targeting SOCS3. *Cancer Medicine*, *12*(11), 12639-12652. https://doi.org/10.1002/cam4.5954

Guardia, C. M., Jain, A., Mattera, R., Friefeld, A., Li, Y., & Bonifacino, J. S. (2021). RUSC2 and WDR47 oppositely regulate kinesin–1-dependent distribution of ATG9A to the cell periphery. *Molecular Biology of the Cell*, *32*(21), ar25. https://doi.org/10.1091/mbc.E21-06-0295

Guardia, C. M., Tan, X.-F., Lian, T., Rana, M. S., Zhou, W., Christenson, E. T., Lowry, A. J., Faraldo-Gómez, J. D., Bonifacino, J. S., Jiang, J., & Banerjee, A. (2020). Structure of Human ATG9A, the Only Transmembrane Protein of the Core Autophagy Machinery. *Cell reports*, *31*(13), 107837. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107837

Guo, J. Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M. S., Karantza, V., Coller, H. A., DiPaola, R. S., Gelinas, C., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & Development*, *25*(5), 460-470. https://doi.org/10.1101/gad.2016311

Guo, J. Y., Karsli-Uzunbas, G., Mathew, R., Aisner, S. C., Kamphorst, J. J., Strohecker, A. M., Chen, G., Price, S., Lu, W., Teng, X., Snyder, E., Santanam, U., DiPaola, R. S., Jacks, T., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2013). Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. *Genes & Development*, *27*(13), 1447-1461. https://doi.org/10.1101/gad.219642.113

Guo, J. Y., Teng, X., Laddha, S. V., Ma, S., Van Nostrand, S. C., Yang, Y., Khor, S., Chan, C. S., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2016). Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes & Development*, *30*(15), 1704-1717. https://doi.org/10.1101/gad.283416.116

Guo, W., Du, K., Luo, S., & Hu, D. (2022). Recent Advances of Autophagy in Non-Small Cell Lung Cancer : From Basic Mechanisms to Clinical Application. *Frontiers in Oncology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.861959

Guo, Y., Chang, C., Huang, R., Liu, B., Bao, L., & Liu, W. (2012). AP1 is essential for generation of autophagosomes from trans-Golgi network. *Journal of Cell Science*. https://doi.org/10.1242/jcs.093203

Guo, Y., Hao, Y., Shen, L., Du, Y., Wang, X., Gao, L., Feng, X., Zhai, Y., Liu, Z., Xu, E., Yang, Y., Xi, Y., Yang, B., & Zhang, L. (2023). TSTA3 overexpression promotes malignant characteristics in LUSC by regulating LAMP2-mediated autophagy and tumor microenvironment. *Cancer Cell International*, *23*, 285. https://doi.org/10.1186/s12935-023-03109-z

Guo, Z., Hu, L., Wang, Q., Wang, Y., Liu, X.-P., Chen, C., Li, S., & Hu, W. (2023). Molecular Characterization and Prognosis of Lactate-Related Genes in Lung Adenocarcinoma. *Current Oncology*, *30*(3), 2845-2861. https://doi.org/10.3390/curroncol30030217

Gurkar, A. U., Chu, K., Raj, L., Bouley, R., Lee, S.-H., Kim, Y.-B., Dunn, S. E., Mandinova, A., & Lee, S. W. (2013). Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1 mediated autophagy during metabolic stress. *Nature communications*, *4*, 2189. https://doi.org/10.1038/ncomms3189

Guzy, R. D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K. D., Simon, M. C., Hammerling, U., & Schumacker, P. T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metabolism*, *1*(6), 401-408. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.001

Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., & Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, *30*(2), 214-226. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003

Haist, M., Stege, H., Grabbe, S., & Bros, M. (2021). The Functional Crosstalk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells within the Immunosuppressive Tumor Microenvironment. *Cancers*, *13*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/cancers13020210

Hamidi, H., & Ivaska, J. (2018). Every step of the way : Integrins in cancer progression and metastasis. *Nature reviews. Cancer*, *18*(9), 533-548. https://doi.org/10.1038/s41568-018-0038-z

Han, Y., Yu, Y., Miao, D., Zhou, M., Zhao, J., Shao, Z., Jin, R., Le, X., Li, W., & Xia, Y. (2024). Targeting MET in NSCLC : An Ever-Expanding Territory. *JTO Clinical and Research Reports*, *5*(2). https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2023.100630

Hanada, T., Noda, N. N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., & Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy *. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(52), 37298-37302. https://doi.org/10.1074/jbc.C700195200

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer : The next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Hapke, R., & Haake, S. M. (2020). Hypoxia-induced epithelial to mesenchymal transition in cancer. *Cancer letters*, *487*, 10-20. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.05.012

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.-L., & Mizushima, N. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, *181*(3), 497-510. https://doi.org/10.1083/jcb.200712064

Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., & Ron, D. (2000). *Perk* Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Molecular Cell*, *5*(5), 897-904. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80330-5

He, X., Lee, B., & Jiang, Y. (2016). Cell-ECM Interactions in Tumor Invasion. In K. A. Rejniak (Éd.), *Systems Biology of Tumor Microenvironment : Quantitative Modeling and Simulations* (p. 73-91). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42023-3_4

Heist, R. S., Zhai, R., Liu, G., Zhou, W., Lin, X., Su, L., Asomaning, K., Lynch, T. J., Wain, J. C., & Christiani, D. C. (2008). VEGFA Polymorphisms and Survival in Early-Stage Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(6), 856-862. https://doi.org/10.1200/JCO.2007.13.5947

Henze, A.-T., & Mazzone, M. (s. d.). The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(10), 3672-3679. https://doi.org/10.1172/JCI84427

Hergovich, A., Lamla, S., Nigg, E. A., & Hemmings, B. A. (2007). Centrosome-Associated NDR Kinase Regulates Centrosome Duplication. *Molecular Cell*, *25*(4), 625-634. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.01.020

Hernansanz-Agustín, P., Choya-Foces, C., Carregal-Romero, S., Ramos, E., Oliva, T., Villa-Piña, T., Moreno, L., Izquierdo-Álvarez, A., Cabrera-García, J. D., Cortés, A., Lechuga-Vieco, A. V., Jadiya, P., Navarro, E., Parada, E., Palomino-Antolín, A., Tello, D., Acín-Pérez, R., Rodríguez-Aguilera, J. C., Navas, P., … Martínez-Ruiz, A. (2020). Na+ controls hypoxic signalling by the mitochondrial respiratory chain. *Nature*, *586*(7828), 287-291. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2551-y

Hicklin, D. J., & Ellis, L. M. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(5), 1011-1027. https://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.081

Hiemer, S. E., & Varelas, X. (2013). Stem cell regulation by the Hippo pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1830*(2), 2323-2334. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.07.005

Hoefflin, R., Harlander, S., Schäfer, S., Metzger, P., Kuo, F., Schönenberger, D., Adlesic, M., Peighambari, A., Seidel, P., Chen, C., Consenza-Contreras, M., Jud, A., Lahrmann, B., Grabe, N., Heide, D., Uhl, F. M., Chan, T. A., Duyster, J., Zeiser, R., … Frew, I. J. (2020). HIF-1α and HIF-2α differently regulate tumour development and inflammation of clear cell renal cell carcinoma in mice. *Nature Communications*, *11*, 4111. https://doi.org/10.1038/s41467-020-17873-3

Hofbauer, K.-H., Gess, B., Lohaus, C., Meyer, H. E., Katschinski, D., & Kurtz, A. (2003). Oxygen tension regulates the expression of a group of procollagen hydroxylases. *European Journal of Biochemistry*, *270*(22), 4515-4522. https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03846.x

Hofmann, T. G., Möller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Dröge, W., Will, H., & Schmitz, M. L. (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nature Cell Biology*, *4*(1), 1-10. https://doi.org/10.1038/ncb715

Hong, A. W., Meng, Z., Yuan, H., Plouffe, S. W., Moon, S., Kim, W., Jho, E., & Guan, K. (2017). Osmotic stress-induced phosphorylation by NLK at Ser128 activates YAP. *EMBO Reports*, *18*(1), 72-86. https://doi.org/10.15252/embr.201642681

Hong, B.-J., Kim, J., Jeong, H., Bok, S., Kim, Y.-E., & Ahn, G.-O. (2016). Tumor hypoxia and reoxygenation : The yin and yang for radiotherapy. *Radiation Oncology Journal*, *34*(4), 239-249. https://doi.org/10.3857/roj.2016.02012

Horsman, M. R., & Vaupel, P. (2016). Pathophysiological Basis for the Formation of the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*, *6*, 66. https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00066

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.-L., Oshiro, N., & Mizushima, N. (2009). Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(7), 1981-1991. https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1248

Hsu, C. L., Lee, E. X., Gordon, K. L., Paz, E. A., Shen, W.-C., Ohnishi, K., Meisenhelder, J., Hunter, T., & La Spada, A. R. (2018). MAP4K3 mediates amino acid-dependent regulation of autophagy via phosphorylation of TFEB. *Nature Communications*, *9*, 942. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03340-7

Hsu, P.-C., Miao, J., Huang, Z., Yang, Y.-L., Xu, Z., You, J., Dai, Y., Yeh, C.-C., Chan, G., Liu, S., Urisman, A., Yang, C.-T., Jablons, D. M., & You, L. (2018). Inhibition of yes-associated protein suppresses brain metastasis of human lung adenocarcinoma in a murine model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *22*(6), 3073-3085. https://doi.org/10.1111/jcmm.13582

Hu, Y.-L., DeLay, M., Jahangiri, A., Molinaro, A. M., Rose, S. D., Carbonell, W. S., & Aghi, M. K. (2012). Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Adaptation to Antiangiogenic Treatment in Glioblastoma. *Cancer Research*, *72*(7), 1773-1783. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3831

Huang, F., Wang, B.-R., & Wang, Y.-G. (2018). Role of autophagy in tumorigenesis, metastasis, targeted therapy and drug resistance of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(41), 4643-4651. https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i41.4643

Huang, J., Birmingham, C. L., Shahnazari, S., Shiu, J., Zheng, Y. T., Smith, A. C., Campellone, K. G., Heo, W. D., Gruenheid, S., Meyer, T., Welch, M. D., Ktistakis, N. T., Kim, P. K., Klionsky, D. J., & Brumell, J. H. (2011). Antibacterial autophagy occurs at PI(3)P-enriched domains of the

endoplasmic reticulum and requires Rab1 GTPase. *Autophagy*, *7*(1), 17-26. https://doi.org/10.4161/auto.7.1.13840

Hubbs, J. L., Boyd, J. A., Hollis, D., Chino, J. P., Saynak, M., & Kelsey, C. R. (2010). Factors associated with the development of brain metastases. *Cancer*, *116*(21), 5038-5046. https://doi.org/10.1002/cncr.25254

Hurley, J. H. (2010). The ESCRT Complexes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *45*(6), 463-487. https://doi.org/10.3109/10409238.2010.502516

Hurley, J. H., & Young, L. N. (2017). Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annual Review of Biochemistry*, *86*, 225-244. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044820

Hutt, D. M., Roth, D. M., Vignaud, H., Cullin, C., & Bouchecareilh, M. (2014). The Histone Deacetylase Inhibitor, Vorinostat, Represses Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Expression through Translational Inhibition. *PLoS ONE*, *9*(8), e106224. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106224

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, *408*(6811), 488-492. https://doi.org/10.1038/35044114

Ikeda, S., Nah, J., Shirakabe, A., Zhai, P., Oka, S., Sciarretta, S., Guan, K.-L., Shimokawa, H., & Sadoshima, J. (2021). YAP plays a crucial role in the development of cardiomyopathy in lysosomal storage diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, *131*(5). https://doi.org/10.1172/JCI143173

Imai, K., Hao, F., Fujita, N., Tsuji, Y., Oe, Y., Araki, Y., Hamasaki, M., Noda, T., & Yoshimori, T. (2016). Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *Journal of Cell Science*, jcs.196196. https://doi.org/10.1242/jcs.196196

Inami, Y., Waguri, S., Sakamoto, A., Kouno, T., Nakada, K., Hino, O., Watanabe, S., Ando, J., Iwadate, M., Yamamoto, M., Lee, M.-S., Tanaka, K., & Komatsu, M. (2011). Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology*, *193*(2), 275-284. https://doi.org/10.1083/jcb.201102031

Inoki, K., Zhu, T., & Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, *115*(5), 577-590. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00929-2

Ito, T., Nakamura, A., Tanaka, I., Tsuboi, Y., Morikawa, T., Nakajima, J., Takai, D., Fukayama, M., Sekido, Y., Niki, T., Matsubara, D., & Murakami, Y. (2019). CADM1 associates with Hippo pathway core kinases; membranous co-expression of CADM1 and LATS2 in lung tumors predicts good prognosis. *Cancer Science*, *110*(7), 2284-2295. https://doi.org/10.1111/cas.14040

Itoh, T., Fujita, N., Kanno, E., Yamamoto, A., Yoshimori, T., & Fukuda, M. (2008). Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L and modulates autophagosome formation. *Molecular Biology of the Cell*, *19*(7), 2916-2925. https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1231

Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S., & Fukuda, M. (2011). OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *The Journal of Cell Biology*, *192*(5), 839-853. https://doi.org/10.1083/jcb.201008107

Jaeger, K. D., Kavanagh, M.-C., & Hill, R. P. (2001). Relationship of hypoxia to metastatic ability in rodent tumours. *British Journal of Cancer*, *84*(9), 1280-1285. https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1743

Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., & Eskelinen, E.-L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*, *117*(Pt 20), 4837-4848. https://doi.org/10.1242/jcs.01370

Jain, L., Vargo, C. A., Danesi, R., Sissung, T. M., Price, D. K., Venzon, D., Venitz, J., & Figg, W. D. (2009). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFA) SNPs as Predictive and Prognostic

Markers for Major Solid Tumors. *Molecular cancer therapeutics*, *8*(9), 2496-2508. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0302

Janse van Rensburg, H. J., & Yang, X. (2016). The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis. *Cellular Signalling*, *28*(11), 1761-1772. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.08.004

Jassam, S. A., Maherally, Z., Ashkan, K., Pilkington, G. J., & Fillmore, H. L. (2019). Fucosyltransferase 4 and 7 mediates adhesion of non-small cell lung cancer cells to brain-derived endothelial cells and results in modification of the blood–brain-barrier : In vitro investigation of CD15 and CD15s in lung-to-brain metastasis. *Journal of Neuro-Oncology*, *143*(3), 405-415. https://doi.org/10.1007/s11060-019-03188-x

Javed, R., Mari, M., Trosdal, E., Duque, T., Paddar, M. A., Allers, L., Mudd, M. H., Claude-Taupin, A., Akepati, P. R., Hendrix, E., He, Y., Salemi, M., Phinney, B., Uchiyama, Y., Reggiori, F., & Deretic, V. (2025). ATG9A facilitates the closure of mammalian autophagosomes. *Journal of Cell Biology*, *224*(2), e202404047. https://doi.org/10.1083/jcb.202404047

Jeon, H., Wang, S., Song, J., Gill, H., & Cheng, H. (2025). Update 2025 : Management of Non-Small-Cell Lung Cancer. *Lung*, *203*(1), 53. https://doi.org/10.1007/s00408-025-00801-x

Ji, H., Ramsey, M. R., Hayes, D. N., Fan, C., McNamara, K., Kozlowski, P., Torrice, C., Wu, M. C., Shimamura, T., Perera, S. A., Liang, M.-C., Cai, D., Naumov, G. N., Bao, L., Contreras, C. M., Li, D., Chen, L., Krishnamurthy, J., Koivunen, J., … Wong, K.-K. (2007). LKB1 modulates lung cancer differentiation and metastasis. *Nature*, *448*(7155), 807-810. https://doi.org/10.1038/nature06030

Ji, H., Wang, Z., Perera, S. A., Li, D., Liang, M.-C., Zaghlul, S., McNamara, K., Chen, L., Albert, M., Sun, Y., Al-Hashem, R., Chirieac, L. R., Padera, R., Bronson, R. T., Thomas, R. K., Garraway, L. A., Jänne, P. A., Johnson, B. E., Chin, L., & Wong, K.-K. (2007). Mutations in BRAF and KRAS converge on activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in lung cancer mouse models. *Cancer Research*, *67*(10), 4933-4939. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4592

Ji, X., Zhu, R., Gao, C., Xie, H., Gong, X., & Luo, J. (2024). Hypoxia-Derived Exosomes Promote Lung Adenocarcinoma by Regulating HS3ST1-GPC4-Mediated Glycolysis. *Cancers*, *16*(4), 695. https://doi.org/10.3390/cancers16040695

Jiang, L., Liang, X., Liu, M., Wang, W., Ma, J., Guo, Q., Han, L., Yang, C., & Nan, K. (2014). Reduced expression of liver kinase B1 and Beclin1 is associated with the poor survival of patients with non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, *32*(5), 1931-1938. https://doi.org/10.3892/or.2014.3432

Jiang, S., Wang, R., Yan, H., Jin, L., Dou, X., & Chen, D. (2016). MicroRNA-21 modulates radiation resistance through upregulation of hypoxia-inducible factor-1α-promoted glycolysis in non-small cell lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *13*(5), 4101-4107. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5010

Jiang, W., Takeshita, N., Maeda, T., Sogi, C., Oyanagi, T., Kimura, S., Yoshida, M., Sasaki, K., Ito, A., & Takano-Yamamoto, T. (2021). Connective tissue growth factor promotes chemotaxis of preosteoblasts through integrin α5 and Ras during tensile force-induced intramembranous osteogenesis. *Scientific Reports*, *11*, 2368. https://doi.org/10.1038/s41598-021-82246-9

Jiang, Y., Ji, F., Liu, Y., He, M., Zhang, Z., Yang, J., Wang, N., Zhong, C., Jin, Q., Ye, X., & Chen, T. (2017). Cisplatin-induced autophagy protects breast cancer cells from apoptosis by regulating yes-associated protein. *Oncology Reports*, *38*(6), 3668-3676. https://doi.org/10.3892/or.2017.6035

Jiang, Y., Zhan, H., Zhang, Y., Yang, J., Liu, M., Xu, C., Fan, X., Zhang, J., Zhou, Z., Shi, X., Ramesh, R., & Li, M. (2021). ZIP4 promotes non-small cell lung cancer metastasis by activating snail-N-cadherin signaling axis. *Cancer Letters*, *521*, 71-81. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.08.025

Jiao, X.-D., Qin, B.-D., You, P., Cai, J., & Zang, Y.-S. (2018). The prognostic value of TP53 and its correlation with EGFR mutation in advanced non-small cell lung cancer, an analysis based on cBioPortal data base. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *123*, 70-75. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.07.003

Jin, J., & Yu, G. (2022). Hypoxic lung cancer cell-derived exosomal miR-21 mediates macrophage M2 polarization and promotes cancer cell proliferation through targeting IRF1. *World Journal of Surgical Oncology*, *20*, 241. https://doi.org/10.1186/s12957-022-02706-y

Jin, L., Chen, Y., Cheng, D., He, Z., Shi, X., Du, B., Xi, X., Gao, Y., & Guo, Y. (2021). YAP inhibits autophagy and promotes progression of colorectal cancer via upregulating Bcl-2 expression. *Cell Death & Disease*, *12*(5), 457. https://doi.org/10.1038/s41419-021-03722-8

Joffre, C., Codogno, P., Fanto, M., Hergovich, A., & Camonis, J. (2016). STK38 at the crossroad between autophagy and apoptosis. *Autophagy*, *12*(3), 594-595. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1135283

Joffre, C., Dupont, N., Hoa, L., Gomez, V., Pardo, R., Gonçalves-Pimentel, C., Achard, P., Bettoun, A., Meunier, B., Bauvy, C., Cascone, I., Codogno, P., Fanto, M., Hergovich, A., & Camonis, J. (2015). The Pro-apoptotic STK38 Kinase Is a New Beclin1 Partner Positively Regulating Autophagy. *Current Biology*, *25*(19), 2479-2492. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.08.031

Joo, J. H., Dorsey, F. C., Joshi, A., Hennessy-Walters, K. M., Rose, K. L., McCastlain, K., Zhang, J., Iyengar, R., Jung, C. H., Suen, D.-F., Steeves, M. A., Yang, C.-Y., Prater, S. M., Kim, D.-H., Thompson, C. B., Youle, R. J., Ney, P. A., Cleveland, J. L., & Kundu, M. (2011). Hsp90-Cdc37 chaperone complex regulates Ulk1- and Atg13-mediated mitophagy. *Molecular Cell*, *43*(4), 572-585. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.018

Judith, D., Jefferies, H. B., Boeing, S., Frith, D., Snijders, A. P., & Tooze, S. A. (2019). ATG9A shapes the forming autophagosome through Arfaptin 2 and phosphatidylinositol 4-kinase IIIβ. *The Journal of Cell Biology*, *218*(5), 1634. https://doi.org/10.1083/jcb.201901115

Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., & Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*, *20*(7), 1992-2003. https://doi.org/10.1091/mbc.e08-12-1249

Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science*, *117*(13), 2805-2812. https://doi.org/10.1242/jcs.01131

Kaelin, W. G. (2005). Proline hydroxylation and gene expression. *Annual Review of Biochemistry*, *74*, 115-128. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133142

Kaelin, W. G. (2007). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and clear cell renal carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(2 Pt 2), 680s-684s. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1865

Kaelin, W. G., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans : The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell*, *30*(4), 393-402. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009

Kai, F., Laklai, H., & Weaver, V. M. (2016). Force Matters : Biomechanical Regulation of Cell Invasion and Migration in Disease. *Trends in cell biology*, *26*(7), 486-497. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.03.007

Kakuta, S., Yamaguchi, J., Suzuki, C., Sasaki, M., Kazuno, S., & Uchiyama, Y. (2017). Small GTPase Rab1B is associated with ATG9A vesicles and regulates autophagosome formation. *The FASEB Journal*, *31*(9), 3757-3773. https://doi.org/10.1096/fj.201601052R

Kannangara, A. R., Poole, D. M., McEwan, C. M., Youngs, J. C., Weerasekara, V. K., Thornock, A. M., Lazaro, M. T., Balasooriya, E. R., Oh, L. M., Soderblom, E. J., Lee, J. J., Simmons, D. L., & Andersen, J. L. (2021). BioID reveals an ATG9A interaction with ATG13-ATG101 in the degradation of p62/SQSTM1-ubiquitin clusters. *EMBO Reports*, *22*(10), e51136. https://doi.org/10.15252/embr.202051136

Karanasios, E., Stapleton, E., Manifava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S. A., & Ktistakis, N. T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *Journal of Cell Science*. https://doi.org/10.1242/jcs.132415

Karantza-Wadsworth, V., Patel, S., Kravchuk, O., Chen, G., Mathew, R., Jin, S., & White, E. (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes & Development*, *21*(13), 1621-1635. https://doi.org/10.1101/gad.1565707

Karsli-Uzunbas, G., Guo, J. Y., Price, S., Teng, X., Laddha, S. V., Khor, S., Kalaany, N. Y., Jacks, T., Chan, C. S., Rabinowitz, J. D., & White, E. (2014). Autophagy is Required for Glucose Homeostasis and Lung Tumor Maintenance. *Cancer discovery*, *4*(8), 914-927. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0363

Kaushik, S., & Cuervo, A. M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *19*(6), 365. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6

Kaushik, S., Massey, A. C., & Cuervo, A. M. (2006). Lysosome membrane lipid microdomains : Novel regulators of chaperone-mediated autophagy. *The EMBO Journal*, *25*(17), 3921-3933. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601283

Keller, M., Dubois, F., Teulier, S., Martin, A. P. J., Levallet, J., Maille, E., Brosseau, S., Elie, N., Hergovich, A., Bergot, E., Camonis, J., Zalcman, G., & Levallet, G. (2019). NDR2 kinase contributes to cell invasion and cytokinesis defects induced by the inactivation of RASSF1A tumor-suppressor gene in lung cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, *38*(1), 158. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1145-8

Kennedy, K. M., & Dewhirst, M. W. (2010). Tumor metabolism of lactate : The influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncology (London, England)*, *6*(1), 127-148. https://doi.org/10.2217/fon.09.145

Kessenbrock, K., Plaks, V., & Werb, Z. (2010). Matrix Metalloproteinases : Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, *141*(1), 52-67. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.015

Kienast, Y., von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E. F., Goldbrunner, R., Herms, J., & Winkler, F. (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature Medicine*, *16*(1), 116-122. https://doi.org/10.1038/nm.2072

Kim, H., Choi, S. Y., Lim, J., Lindroth, A. M., & Park, Y. J. (2020). EHMT2 Inhibition Induces Cell Death in Human Non-Small Cell Lung Cancer by Altering the Cholesterol Biosynthesis Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(3), 1002. https://doi.org/10.3390/ijms21031002

Kim, H., Son, S., Ko, Y., & Shin, I. (2021). CTGF regulates cell proliferation, migration, and glucose metabolism through activation of FAK signaling in triple-negative breast cancer. *Oncogene*, *40*(15), 2667-2681. https://doi.org/10.1038/s41388-021-01731-7

Kim, J., Kim, Y. C., Fang, C., Russell, R. C., Kim, J. H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., & Guan, K.-L. (2013). Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*, *152*(1-2), 290-303. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.016

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., & Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, *13*(2), 132-141. https://doi.org/10.1038/ncb2152

Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G. L., & Dang, C. V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase : A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metabolism*, *3*(3), 177-185. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2006.02.002

Kim, K. M., Choi, Y. J., Hwang, J.-H., Kim, A. R., Cho, H. J., Hwang, E. S., Park, J. Y., Lee, S.-H., & Hong, J.-H. (2014). Shear Stress Induced by an Interstitial Level of Slow Flow Increases the Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells through TAZ Activation. *PLoS ONE*, *9*(3), e92427. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092427

Kim, K. W., Moretti, L., Mitchell, L. R., Jung, D. K., & Lu, B. (2009). Combined Bcl-2/Mammalian Target of Rapamycin Inhibition Leads to Enhanced Radiosensitization via Induction of Apoptosis and Autophagy in Non–Small Cell Lung Tumor Xenograft Model. *Clinical Cancer Research*, *15*(19), 6096-6105. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0589

Kim, N.-G., & Gumbiner, B. M. (2015). Adhesion to fibronectin regulates Hippo signaling via the FAK–Src–PI3K pathway. *The Journal of Cell Biology*, *210*(3), 503-515. https://doi.org/10.1083/jcb.201501025

Kim, N.-G., Koh, E., Chen, X., & Gumbiner, B. M. (2011). E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(29), 11930-11935. https://doi.org/10.1073/pnas.1103345108

Kim, S.-J., Kim, J.-S., Park, E. S., Lee, J.-S., Lin, Q., Langley, R. R., Maya, M., He, J., Kim, S.-W., Weihua, Z., Balasubramanian, K., Fan, D., Mills, G. B., Hung, M.-C., & Fidler, I. J. (2011). Astrocytes Upregulate Survival Genes in Tumor Cells and Induce Protection from Chemotherapy. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *13*(3), 286-298. https://doi.org/10.1593/neo.11112

Kim, Y.-M., Jung, C. H., Seo, M., Kim, E. K., Park, J.-M., Bae, S. S., & Kim, D.-H. (2015). mTORC1 phosphorylates UVRAG to negatively regulate autophagosome and endosome maturation. *Molecular Cell*, *57*(2), 207-218. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.013

Kimmelman, A. C., & White, E. (2017). Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism*, *25*(5), 1037-1043. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.04.004

Kiyono, K., Suzuki, H. I., Matsuyama, H., Morishita, Y., Komuro, A., Kano, M. R., Sugimoto, K., & Miyazono, K. (2009). Autophagy is activated by TGF-beta and potentiates TGF-beta-mediated growth inhibition in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Research*, *69*(23), 8844-8852. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4401

Klimek, C., Jahnke, R., Wördehoff, J., Kathage, B., Stadel, D., Behrends, C., Hergovich, A., & Höhfeld, J. (2019). The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, *1866*(10), 1556-1566. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.07.007

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., & Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-

related genes. *Developmental Cell*, *5*(4), 539-545. https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00296-x

Koh, Y. W., Lee, S. J., Han, J.-H., Haam, S., Jung, J., & Lee, H. W. (2019). PD-L1 protein expression in non-small-cell lung cancer and its relationship with the hypoxia-related signaling pathways : A study based on immunohistochemistry and RNA sequencing data. *Lung Cancer*, *129*, 41-47. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2019.01.004

Komatsu, M., Kurokawa, H., Waguri, S., Taguchi, K., Kobayashi, A., Ichimura, Y., Sou, Y.-S., Ueno, I., Sakamoto, A., Tong, K. I., Kim, M., Nishito, Y., Iemura, S., Natsume, T., Ueno, T., Kominami, E., Motohashi, H., Tanaka, K., & Yamamoto, M. (2010). The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nature Cell Biology*, *12*(3), 213-223. https://doi.org/10.1038/ncb2021

Korbecki, J., Simińska, D., Gąssowska-Dobrowolska, M., Listos, J., Gutowska, I., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2021). Chronic and Cycling Hypoxia : Drivers of Cancer Chronic Inflammation through HIF-1 and NF-κB Activation: A Review of the Molecular Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), 10701. https://doi.org/10.3390/ijms221910701

Koyama, S., Akbay, E. A., Li, Y. Y., Aref, A. R., Skoulidis, F., Herter-Sprie, G. S., Buczkowski, K. A., Liu, Y., Awad, M. M., Denning, W. L., Diao, L., Wang, J., Parra-Cuentas, E. R., Wistuba, I. I., Soucheray, M., Thai, T. C., Asahina, H., Kitajima, S., Altabef, A., … Wong, K.-K. (2016). STK11/LKB1 deficiency promotes neutrophil recruitment and proinflammatory cytokine production to suppress T cell activity in the lung tumor microenvironment. *Cancer research*, *76*(5), 999-1008. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1439

Kraya, A. A., Piao, S., Xu, X., Zhang, G., Herlyn, M., Gimotty, P., Levine, B., Amaravadi, R. K., & Speicher, D. W. (2014). Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy*, *11*(1), 60-74. https://doi.org/10.4161/15548627.2014.984273

Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular Cell*, *40*(2), 280-293. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.023

Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., Fredlund, E., Ringnér, M., Mörgelin, M., Bourseau-Guilmain, E., Bengzon, J., & Belting, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(18), 7312-7317. https://doi.org/10.1073/pnas.1220998110

Kuchitsu, Y., & Fukuda, M. (2018). Revisiting Rab7 Functions in Mammalian Autophagy : Rab7 Knockout Studies. *Cells*, *7*(11), 215. https://doi.org/10.3390/cells7110215

Kumar, S., Park, S. H., Cieply, B., Schupp, J., Killiam, E., Zhang, F., Rimm, D. L., & Frisch, S. M. (2011). A pathway for the control of anoikis sensitivity by E-cadherin and epithelial-to-mesenchymal transition. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(19), 4036-4051. https://doi.org/10.1128/MCB.01342-10

Kuo, C.-Y., Chang, Y.-C., Chien, M.-N., Jhuang, J.-Y., Hsu, Y.-C., Huang, S.-Y., & Cheng, S.-P. (2021). SREBP1 promotes invasive phenotypes by upregulating CYR61/CTGF via the Hippo-YAP pathway. *Endocrine-Related Cancer*, *29*(2), 47-58. https://doi.org/10.1530/ERC-21-0256

La Belle Flynn, A., Calhoun, B. C., Sharma, A., Chang, J. C., Almasan, A., & Schiemann, W. P. (2019). Autophagy inhibition elicits emergence from metastatic dormancy by inducing and stabilizing Pfkfb3 expression. *Nature Communications*, *10*, 3668. https://doi.org/10.1038/s41467-019-11640-9

LaGory, E. L., & Giaccia, A. J. (2016). The Ever Expanding Role of HIF in Tumour and Stromal Biology. *Nature cell biology*, *18*(4), 356-365. https://doi.org/10.1038/ncb3330

Lamar, J. M., Stern, P., Liu, H., Schindler, J. W., Jiang, Z.-G., & Hynes, R. O. (2012). The Hippo pathway target, YAP, promotes metastasis through its TEAD-interaction domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(37), E2441-E2450. https://doi.org/10.1073/pnas.1212021109

Lamb, C. A., Yoshimori, T., & Tooze, S. A. (2013). The autophagosome : Origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *14*(12), 759-774. https://doi.org/10.1038/nrm3696

Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*(3), 178-196. https://doi.org/10.1038/nrm3758

Langley, R. R., & Fidler, I. J. (2013). The Biology of Brain Metastasis. *Clinical Chemistry*, *59*(1), 180-189. https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.193342

Lantuejoul, S., Soria, J. C., Moro-Sibilot, D., Morat, L., Veyrenc, S., Lorimier, P., Brichon, P. Y., Sabatier, L., Brambilla, C., & Brambilla, E. (2004). Differential expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung tumours. *British Journal of Cancer*, *90*(6), 1222-1229. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601643

Lau, A., Wang, X.-J., Zhao, F., Villeneuve, N. F., Wu, T., Jiang, T., Sun, Z., White, E., & Zhang, D. D. (2010). A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency : Direct Interaction between Keap1 and p62. *Molecular and Cellular Biology*, *30*(13), 3275-3285. https://doi.org/10.1128/MCB.00248-10

Lazarus, M. B., Novotny, C. J., & Shokat, K. M. (2015). Structure of the human autophagy initiating kinase ULK1 in complex with potent inhibitors. *ACS Chemical Biology*, *10*(1), 257-261. https://doi.org/10.1021/cb500835z

Lazova, R., Camp, R. L., Klump, V., Siddiqui, S. F., Amaravadi, R. K., & Pawelek, J. M. (2012). Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *18*(2), 370-379. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1282

Leask, A., Nguyen, J., Naik, A., Chitturi, P., & Riser, B. L. (2024). The role of yes activated protein (YAP) in melanoma metastasis. *iScience*, *27*(6), 109864. https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.109864

LeBlanc, L., Ramirez, N., & Kim, J. (2021). Context-dependent roles of YAP/TAZ in stem cell fates and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *78*(9), 4201-4219. https://doi.org/10.1007/s00018-021-03781-2

Lee, E. F., Smith, N. A., Soares da Costa, T. P., Meftahi, N., Yao, S., Harris, T. J., Tran, S., Pettikiriarachchi, A., Perugini, M. A., Keizer, D. W., Evangelista, M., Smith, B. J., & Fairlie, W. D. (2019). Structural insights into BCL2 pro-survival protein interactions with the key autophagy regulator BECN1 following phosphorylation by STK4/MST1. *Autophagy*, *15*(5), 785-795. https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1564557

Lee, H. J., Diaz, M. F., Price, K. M., Ozuna, J. A., Zhang, S., Sevick-Muraca, E. M., Hagan, J. P., & Wenzel, P. L. (2017). Fluid shear stress activates YAP1 to promote cancer cell motility. *Nature Communications*, *8*(1), 14122. https://doi.org/10.1038/ncomms14122

Lee, J. G., Shin, J. H., Shim, H. S., Lee, C. Y., Kim, D. J., Kim, Y. S., & Chung, K. Y. (2015). Autophagy contributes to the chemo-resistance of non-small cell lung cancer in hypoxic conditions. *Respiratory Research*, *16*, 138. https://doi.org/10.1186/s12931-015-0285-4

Lee, S. Y., Kim, M. J., Jin, G., Yoo, S. S., Park, J. Y., Choi, J. E., Jeon, H. S., Cho, S., Lee, E. B., Cha, S. I., Park, T.-I., Kim, C. H., Jung, T. H., & Park, J. Y. (2010). Somatic Mutations in Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathway Genes in Non-small Cell Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology*, *5*(11), 1734-1740. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f0beca

Lee, S.-J., No, Y. R., Dang, D. T., Dang, L. H., Yang, V. W., Shim, H., & Yun, C. C. (2013). Regulation of Hypoxia-inducible Factor 1α (HIF-1α) by Lysophosphatidic Acid Is Dependent on Interplay between p53 and Krüppel-like Factor 5. *The Journal of Biological Chemistry*, *288*(35), 25244-25253. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489708

Lee, Y. A., Noon, L. A., Akat, K. M., Ybanez, M. D., Lee, T.-F., Berres, M.-L., Fujiwara, N., Goossens, N., Chou, H.-I., Parvin-Nejad, F. P., Khambu, B., Kramer, E. G. M., Gordon, R., Pfleger, C., Germain, D., John, G. R., Campbell, K. N., Yue, Z., Yin, X.-M., … Friedman, S. L. (2018). Autophagy is a gatekeeper of hepatic differentiation and carcinogenesis by controlling the degradation of Yap. *Nature Communications*, *9*(1), 4962. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07338-z

Leonetti, A., Facchinetti, F., Rossi, G., Minari, R., Conti, A., Friboulet, L., Tiseo, M., & Planchard, D. (2018). BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC) : Pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treatment Reviews*, *66*, 82-94. https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.04.006

Leong, H. S., Robertson, A. E., Stoletov, K., Leith, S. J., Chin, C. A., Chien, A. E., Hague, M. N., Ablack, A., Carmine-Simmen, K., McPherson, V. A., Postenka, C. O., Turley, E. A., Courtneidge, S. A., Chambers, A. F., & Lewis, J. D. (2014). Invadopodia Are Required for Cancer Cell Extravasation and Are a Therapeutic Target for Metastasis. *Cell Reports*, *8*(5), 1558-1570. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.050

Levallet, J., Biojout, T., Bazille, C., Douyère, M., Dubois, F., Ferreira, D. L., Taylor, J., Teulier, S., Toutain, J., Elie, N., Bernaudin, M., Valable, S., Bergot, E., & Levallet, G. (2023). Hypoxia-induced activation of NDR2 underlies brain metastases from Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Death & Disease*, *14*(12), 823. https://doi.org/10.1038/s41419-023-06345-3

Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, *132*(1), 27-42. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018

Li, C., Chen, L., Song, W., Peng, B., Zhu, J., & Fang, L. (2021). DICER activates autophagy and promotes cisplatin resistance in non-small cell lung cancer by binding with let-7i-5p. *Acta Histochemica*, *123*(7), 151788. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2021.151788

Li, C., Lin, X., & Su, J. (2024). HSP90B1 regulates autophagy via PI3K/AKT/mTOR signaling, mediating HNSC biological behaviors. *PeerJ*, *12*, e17028. https://doi.org/10.7717/peerj.17028

Li, C. Y., Little, J. B., Hu, K., Zhang, W., Zhang, L., Dewhirst, M. W., & Huang, Q. (2001). Persistent genetic instability in cancer cells induced by non-DNA-damaging stress exposures. *Cancer Research*, *61*(2), 428-432.

Li, J., Yang, B., Zhou, Q., Wu, Y., Shang, D., Guo, Y., Song, Z., Zheng, Q., & Xiong, J. (2013). Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation of epithelial–mesenchymal transition. *Carcinogenesis*, *34*(6), 1343-1351. https://doi.org/10.1093/carcin/bgt063

Li, Q., Zhou, X., Huang, T., Tang, Y., Liu, B., Peng, P., Sun, L., Wang, Y., & Yuan, X. (2017). The Thr300Ala variant of ATG16L1 is associated with decreased risk of brain metastasis in patients with non-

small cell lung cancer. *Autophagy*, *13*(6), 1053-1063. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1308997

Li, S., Zeng, X., Ma, R., & Wang, L. (2018). MicroRNA-21 promotes the proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer A549 cells by regulating autophagy activity via AMPK/ULK1 signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *16*(3), 2038-2045. https://doi.org/10.3892/etm.2018.6370

Li, T., Guo, T., Liu, H., Jiang, H., & Wang, Y. (2021). Platelet-derived growth factor-BB mediates pancreatic cancer malignancy via regulation of the Hippo/Yes-associated protein signaling pathway. *Oncology Reports*, *45*(1), 83-94. https://doi.org/10.3892/or.2020.7859

Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R., & Gu, W. (2012). Tumor Suppression in the Absence of p53-Mediated Cell-Cycle Arrest, Apoptosis, and Senescence. *Cell*, *149*(6), 1269-1283. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.026

Li, W., Li, J., & Bao, J. (2012). Microautophagy : Lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *69*(7), 1125-1136. https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5

Li, W., Yue, F., Dai, Y., Shi, B., Xu, G., Jiang, X., Zhou, X., Pfeifer, G. P., & Liu, L. (2019). Suppressor of hepatocellular carcinoma RASSF1A activates autophagy initiation and maturation. *Cell Death and Differentiation*, *26*(8), 1379-1395. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0211-7

Li, X., Guo, Z., Yang, Y., Xiong, Y., Zhang, X., Qiao, S., Wei, K., Fang, J., & Ma, Y. (2024). Neurofibromin 2 modulates Mammalian Ste2-like kinases1/2 and large tumor suppressor gene1 expression in A549 lung cancer cell line. *American Journal of Translational Research*, *16*(6), 2571-2578. https://doi.org/10.62347/TPCM6776

Li, X., Rydzewski, N., Hider, A., Zhang, X., Yang, J., Wang, W., Gao, Q., Cheng, X., & Xu, H. (2016). A Molecular Mechanism to Regulate Lysosome Motility for Lysosome Positioning and Tubulation. *Nature cell biology*, *18*(4), 404-417. https://doi.org/10.1038/ncb3324

Li, X., Xiao, Y., Zhu, Y., Li, P., Zhou, J., Yang, J., Chen, Z., Du, H., Yu, H., Guo, Y., Bian, H., & Li, Z. (2024). Regulation of autophagy by ST3GAL2-mediated α2-3 sialylated glycosphingolipids in hepatic encephalopathy. *International Journal of Biological Macromolecules*, *278*, 135196. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135196

Li, Y., Li, C., Shi, H., Lou, L., & Liu, P. (2015). The association between the rs11549465 polymorphism in the hif-1α gene and cancer risk : A meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*(2), 1561-1574.

Li, Y., Xu, Y., Wang, R., Li, W., He, W., Luo, X., & Ye, Y. (2020). Expression of Notch–Hif-1α signaling pathway in liver regeneration of rats. *The Journal of International Medical Research*, *48*(9), 0300060520943790. https://doi.org/10.1177/0300060520943790

Li, Y., Zhou, H., Li, F., Chan, S. W., Lin, Z., Wei, Z., Yang, Z., Guo, F., Lim, C. J., Xing, W., Shen, Y., Hong, W., Long, J., & Zhang, M. (2015). Angiomotin binding-induced activation of Merlin/NF2 in the Hippo pathway. *Cell Research*, *25*(7), 801-817. https://doi.org/10.1038/cr.2015.69

Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., & Rich, J. N. (2009). Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer cell*, *15*(6), 501-513. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.03.018

Liang, C., Lee, J., Inn, K., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., & Jung, J. U. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature Cell Biology*, *10*(7), 776-787. https://doi.org/10.1038/ncb1740

Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z.-X., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D. J., Gutterman, J. U., Walker, C. L., Slingerland, J. M., & Mills, G. B. (2007). The energy sensing LKB1–AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature Cell Biology*, *9*(2), 218-224. https://doi.org/10.1038/ncb1537

Liang, L., Hui, K., Hu, C., Wen, Y., Yang, S., Zhu, P., Wang, L., Xia, Y., Qiao, Y., Sun, W., Fei, J., Chen, T., Zhao, F., Yang, B., & Jiang, X. (2019). Autophagy inhibition potentiates the anti-angiogenic property of multikinase inhibitor anlotinib through JAK2/STAT3/VEGFAA signaling in non-small cell lung cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *38*, 71. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1093-3

Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, *402*(6762), 672-676. https://doi.org/10.1038/45257

Lin, Q., Wang, X., & Hu, Y. (2023). The opportunities and challenges in immunotherapy : Insights from the regulation of PD-L1 in cancer cells. *Cancer Letters*, *569*, 216318. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2023.216318

Lin, S., Taylor, M. D., Singh, P. K., & Yang, S. (2021). How Does Fascin Promote Cancer Metastasis? *The FEBS journal*, *288*(5), 1434-1446. https://doi.org/10.1111/febs.15484

Lin, S.-Y., Li, T. Y., Liu, Q., Zhang, C., Li, X., Chen, Y., Zhang, S.-M., Lian, G., Liu, Q., Ruan, K., Wang, Z., Zhang, C.-S., Chien, K.-Y., Wu, J., Li, Q., Han, J., & Lin, S.-C. (2012). GSK3-TIP60-ULK1 Signaling Pathway Links Growth Factor Deprivation to Autophagy. *Science*. https://doi.org/10.1126/science.1217032

Liu, C., Zheng, S., Wang, Z., Wang, S., Wang, X., Yang, L., Xu, H., Cao, Z., Feng, X., Xue, Q., Wang, Y., Sun, N., & He, J. (2022). KRAS-G12D mutation drives immune suppression and the primary resistance of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in non-small cell lung cancer. *Cancer Communications (London, England)*, *42*(9), 828-847. https://doi.org/10.1002/cac2.12327

Liu, S., Yao, S., Yang, H., Liu, S., & Wang, Y. (2023). Autophagy : Regulator of cell death. *Cell Death & Disease*, *14*(10), 648. https://doi.org/10.1038/s41419-023-06154-8

Liu, S., Zhan, Y., Luo, J., Feng, J., Lu, J., Zheng, H., Wen, Q., & Fan, S. (2019). Roles of exosomes in the carcinogenesis and clinical therapy of non-small cell lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *111*, 338-346. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.088

Lobo, N. A., Shimono, Y., Qian, D., & Clarke, M. F. (2007). The Biology of Cancer Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *23*(Volume 23, 2007), 675-699. https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104154

Lock, R., Kenific, C. M., Leidal, A. M., Salas, E., & Debnath, J. (2014). Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion. *Cancer Discovery*, *4*(4), 466-479. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0841

Lock, R., Roy, S., Kenific, C. M., Su, J. S., Salas, E., Ronen, S. M., & Debnath, J. (2011). Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Molecular Biology of the Cell*, *22*(2), 165-178. https://doi.org/10.1091/mbc.E10-06-0500

Lodge, E. J., Santambrogio, A., Russell, J. P., Xekouki, P., Jacques, T. S., Johnson, R. L., Thavaraj, S., Bornstein, S. R., & Andoniadou, C. L. (2019). Homeostatic and tumourigenic activity of SOX2+ pituitary stem cells is controlled by the LATS/YAP/TAZ cascade. *eLife*, *8*, e43996. https://doi.org/10.7554/eLife.43996

Löfstedt, T., Fredlund, E., Noguera, R., Navarro, S., Holmquist-Mengelbier, L., Beckman, S., Påhlman, S., & Axelson, H. (2009). HIF-1alpha induces MXI1 by alternate promoter usage in human

neuroblastoma cells. *Experimental Cell Research*, *315*(11), 1924-1936. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.02.015

Lone, S. N., Nisar, S., Masoodi, T., Singh, M., Rizwan, A., Hashem, S., El-Rifai, W., Bedognetti, D., Batra, S. K., Haris, M., Bhat, A. A., & Macha, M. A. (2022). Liquid biopsy : A step closer to transform diagnosis, prognosis and future of cancer treatments. *Molecular Cancer*, *21*, 79. https://doi.org/10.1186/s12943-022-01543-7

Longatti, A., Lamb, C. A., Razi, M., Yoshimura, S., Barr, F. A., & Tooze, S. A. (2012). TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *Journal of Cell Biology*, *197*(5), 659-675. https://doi.org/10.1083/jcb.201111079

Lőrincz, P., & Juhász, G. (2020). Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*, *432*(8), 2462-2482. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.028

Lu, X., Liu, Q.-X., Zhang, J., Zhou, D., Yang, G.-X., Li, M.-Y., Qiu, Y., Chen, Q., Zheng, H., & Dai, J.-G. (2020). PINK1 Overexpression Promotes Cell Migration and Proliferation via Regulation of Autophagy and Predicts a Poor Prognosis in Lung Cancer Cases. *Cancer Management and Research*, *12*, 7703-7714. https://doi.org/10.2147/CMAR.S262466

Lu, Z., Luo, R. Z., Lu, Y., Zhang, X., Yu, Q., Khare, S., Kondo, S., Kondo, Y., Yu, Y., Mills, G. B., Liao, W. S.-L., & Bast, R. C. (2008). The tumor suppressor gene *ARHI* regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(12), 3917-3929. https://doi.org/10.1172/JCI35512

Luo, F., Liu, X., Yan, N., Li, S., Cao, G., Cheng, Q., Xia, Q., & Wang, H. (2006). Hypoxia-inducible transcription factor-1α promotes hypoxia-induced A549 apoptosis via a mechanism that involves the glycolysis pathway. *BMC Cancer*, *6*, 26. https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-26

Luo, Q., Liu, Q., Cheng, H., Wang, J., Zhao, T., Zhang, J., Mu, C., Meng, Y., Chen, L., Zhou, C., Lei, H., Yang, J., Chen, G., Li, Y., Pan, L., Chen, Q., & Zhu, Y. (2022). Nondegradable ubiquitinated ATG9A organizes Golgi integrity and dynamics upon stresses. *Cell Reports*, *40*(7), 111195. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111195

Luo, S., Garcia-Arencibia, M., Zhao, R., Puri, C., Toh, P. P. C., Sadiq, O., & Rubinsztein, D. C. (2012). Bim Inhibits Autophagy by Recruiting Beclin 1 to Microtubules. *Molecular Cell*, *47*(3), 359-370. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.040

Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R. N., Pandey, A., & Semenza, G. L. (2011). Pyruvate Kinase M2 is a PHD3-stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell*, *145*(5), 732-744. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.054

Lv, X.-B., Liu, C.-Y., Wang, Z., Sun, Y.-P., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., & Guan, K.-L. (2015). PARD3 induces TAZ activation and cell growth by promoting LATS1 and PP1 interaction. *EMBO Reports*, *16*(8), 975-985. https://doi.org/10.15252/embr.201439951

Lv, Y., Zhao, S., Han, J., Zheng, L., Yang, Z., & Zhao, L. (2015). Hypoxia-inducible factor-1α induces multidrug resistance protein in colon cancer. *OncoTargets and therapy*, *8*, 1941-1948. https://doi.org/10.2147/OTT.S82835

Ma, B., Chen, Y., Chen, L., Cheng, H., Mu, C., Li, J., Gao, R., Zhou, C., Cao, L., Liu, J., Zhu, Y., Chen, Q., & Wu, S. (2015). Hypoxia regulates Hippo signalling through the SIAH2 ubiquitin E3 ligase. *Nature Cell Biology*, *17*(1), 95-103. https://doi.org/10.1038/ncb3073

Ma, B., Cheng, H., Gao, R., Mu, C., Chen, L., Wu, S., Chen, Q., & Zhu, Y. (2016). Zyxin-Siah2–Lats2 axis mediates cooperation between Hippo and TGF-β signalling pathways. *Nature Communications*, *7*, 11123. https://doi.org/10.1038/ncomms11123

Ma, F., Ding, M.-G., Lei, Y.-Y., Luo, L.-H., Jiang, S., Feng, Y.-H., & Liu, X.-L. (2020). SKIL facilitates tumorigenesis and immune escape of NSCLC via upregulating TAZ/autophagy axis. *Cell Death & Disease*, *11*(12), 1028. https://doi.org/10.1038/s41419-020-03200-7

Ma, X., Le Teuff, G., Lacas, B., Tsao, M. S., Graziano, S., Pignon, J.-P., Douillard, J.-Y., Le Chevalier, T., Seymour, L., Filipits, M., Pirker, R., Jänne, P. A., Shepherd, F. A., Brambilla, E., Soria, J.-C., Hainaut, P., & LACE-Bio Collaborative Group. (2016). Prognostic and Predictive Effect of TP53 Mutations in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer from Adjuvant Cisplatin-Based Therapy Randomized Trials : A LACE-Bio Pooled Analysis. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *11*(6), 850-861. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.02.002

Ma, X., Zhang, H., Xue, X., & Shah, Y. M. (2017). Hypoxia-inducible factor 2α (HIF-2α) promotes colon cancer growth by potentiating Yes-associated protein 1 (YAP1) activity. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(41), 17046-17056. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805655

Ma, X.-H., Piao, S., Wang, D., Mcafee, Q. W., Nathanson, K. L., Lum, J. J., Li, L. Z., & Amaravadi, R. K. (2011). Measurements of Tumor Cell Autophagy Predict Invasiveness, Resistance to Chemotherapy, and Survival in Melanoma. *Clinical Cancer Research*, *17*(10), 3478-3489. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2372

Macintosh, R. L., Timpson, P., Thorburn, J., Anderson, K. I., Thorburn, A., & Ryan, K. M. (2012). Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model. *Cell Cycle*, *11*(10), 2022-2029. https://doi.org/10.4161/cc.20424

Maeda, S., Yamamoto, H., Kinch, L. N., Garza, C. M., Takahashi, S., Otomo, C., Grishin, N. V., Forli, S., Mizushima, N., & Otomo, T. (2020). Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A. *Nature structural & molecular biology*, *27*(12), 1194-1201. https://doi.org/10.1038/s41594-020-00520-2

Maejima, Y., Kyoi, S., Zhai, P., Liu, T., Li, H., Ivessa, A., Sciarretta, S., Del Re, D. P., Zablocki, D. K., Hsu, C.-P., Lim, D.-S., Isobe, M., & Sadoshima, J. (2013). Mst1 inhibits autophagy by promoting Beclin1-Bcl-2 interaction. *Nature medicine*, *19*(11), 1478-1488. https://doi.org/10.1038/nm.3322

Mailler, E., Guardia, C. M., Bai, X., Jarnik, M., Williamson, C. D., Li, Y., Maio, N., Golden, A., & Bonifacino, J. S. (2021). The autophagy protein ATG9A enables lipid mobilization from lipid droplets. *Nature Communications*, *12*(1), 6750. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26999-x

Mammadova-Bach, E., Zigrino, P., Brucker, C., Bourdon, C., Freund, M., Arcangelis, A. D., Abrams, S. I., Orend, G., Gachet, C., & Mangin, P. H. (2016). Platelet integrin **α**6**β**1 controls lung metastasis through direct binding to cancer cell–derived ADAM9. *JCI Insight*, *1*(14). https://doi.org/10.1172/jci.insight.88245

Marcassa, E., Raimondi, M., Anwar, T., Eskelinen, E.-L., Myers, M. P., Triolo, G., Schneider, C., & Demarchi, F. (2017). Calpain mobilizes Atg9/Bif-1 vesicles from Golgi stacks upon autophagy induction by thapsigargin. *Biology Open*, *6*(5), 551-562. https://doi.org/10.1242/bio.022806

Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J., & Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology*, *190*(6), 1005-1022. https://doi.org/10.1083/jcb.200912089

Martin, A. P., Jacquemyn, M., Lipecka, J., Chhuon, C., Aushev, V. N., Meunier, B., Singh, M. K., Carpi, N., Piel, M., Codogno, P., Hergovich, A., Parrini, M. C., Zalcman, G., Guerrera, I. C., Daelemans, D., & Camonis, J. H. (2019). STK38 kinase acts as XPO1 gatekeeper regulating the nuclear export

of autophagy proteins and other cargoes. *EMBO Reports*, *20*(11), e48150. https://doi.org/10.15252/embr.201948150

Martín, F., Alcon, C., Marín, E., Morales-Sánchez, P., Manzano-Muñoz, A., Díaz, S., García, M., Samitier, J., Lu, A., Villanueva, A., Reguart, N., Teixido, C., & Montero, J. (2025). Novel selective strategies targeting the BCL-2 family to enhance clinical efficacy in ALK-rearranged non-small cell lung cancer. *Cell Death & Disease*, *16*(1), 194. https://doi.org/10.1038/s41419-025-07513-3

Martin, K., Reimann, A., Fritz, R. D., Ryu, H., Jeon, N. L., & Pertz, O. (2016). Spatio-temporal co-ordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. *Scientific Reports*, *6*, 21901. https://doi.org/10.1038/srep21901

Martin-Belmonte, F., & Perez-Moreno, M. (2012). Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature Reviews Cancer*, *12*(1), 23-38. https://doi.org/10.1038/nrc3169

Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1α pathway : Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, *5*(5), 378-389. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2007). Role of autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer*, *7*(12), 961-967. https://doi.org/10.1038/nrc2254

Mathew, R., Karp, C., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., DiPaola, R. S., Karantza-Wadsworth, V., & White, E. (2009). Autophagy Suppresses Tumorigenesis Through Elimination of p62. *Cell*, *137*(6), 1062-1075. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048

Mathieu, J., Zhang, Z., Nelson, A., Lamba, D. A., Reh, T. A., Ware, C., & Ruohola-Baker, H. (2013). Hypoxia induces re-entry of committed cells into pluripotency. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, *31*(9), 1737-1748. https://doi.org/10.1002/stem.1446

Matoba, K., Kotani, T., Tsutsumi, A., Tsuji, T., Mori, T., Noshiro, D., Sugita, Y., Nomura, N., Iwata, S., Ohsumi, Y., Fujimoto, T., Nakatogawa, H., Kikkawa, M., & Noda, N. N. (2020). Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion. *Nature Structural & Molecular Biology*, *27*(12), 1185-1193. https://doi.org/10.1038/s41594-020-00518-w

Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N. T., Izumi, T., Noda, T., & Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *Journal of Cell Biology*, *190*(4), 511-521. https://doi.org/10.1083/jcb.200911141

Mattera, R., De Pace, R., & Bonifacino, J. S. (2020). The role of AP-4 in cargo export from the trans-Golgi network and hereditary spastic paraplegia. *Biochemical Society Transactions*, *48*(5), 1877-1888. https://doi.org/10.1042/BST20190664

Mattera, R., Park, S. Y., De Pace, R., Guardia, C. M., & Bonifacino, J. S. (2017). AP-4 mediates export of ATG9A from the trans-Golgi network to promote autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(50), E10697-E10706. https://doi.org/10.1073/pnas.1717327114

Mauthe, M., Jacob, A., Freiberger, S., Hentschel, K., Stierhof, Y.-D., Codogno, P., & Proikas-Cezanne, T. (2011). Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy*, *7*(12), 1448-1461. https://doi.org/10.4161/auto.7.12.17802

Maycotte, P., Gearheart, C. M., Barnard, R., Aryal, S., Mulcahy Levy, J. M., Fosmire, S. P., Hansen, R. J., Morgan, M. J., Porter, C. C., Gustafson, D. L., & Thorburn, A. (2014). STAT3-Mediated Autophagy Dependence Identifies Subtypes of Breast Cancer where Autophagy Inhibition can be Efficacious. *Cancer research*, *74*(9), 2579-2590. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3470

Maycotte, P., Jones, K. L., Goodall, M. L., Thorburn, J., & Thorburn, A. (2015). Autophagy Supports Breast Cancer Stem Cell Maintenance by Regulating IL6 Secretion. *Molecular Cancer Research*, *13*(4), 651-658. https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0487

McAlpine, F., Williamson, L. E., Tooze, S. A., & Chan, E. Y. W. (2013). Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy*, *9*(3), 361-373. https://doi.org/10.4161/auto.23066

McEwan, D. G., Popovic, D., Gubas, A., Terawaki, S., Suzuki, H., Stadel, D., Coxon, F. P., Miranda de Stegmann, D., Bhogaraju, S., Maddi, K., Kirchof, A., Gatti, E., Helfrich, M. H., Wakatsuki, S., Behrends, C., Pierre, P., & Dikic, I. (2015). PLEKHM1 Regulates Autophagosome-Lysosome Fusion through HOPS Complex and LC3/GABARAP Proteins. *Molecular Cell*, *57*(1), 39-54. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.006

Melwani, P. K., & Pandey, B. N. (2023). Tunneling nanotubes : The intercellular conduits contributing to cancer pathogenesis and its therapy. *Biochimica Et Biophysica Acta. Reviews on Cancer*, *1878*(6), 189028. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189028

Meng, S., Wang, G., Lu, Y., & Fan, Z. (2018a). Functional cooperation between HIF-1α and c-Jun in mediating primary and acquired resistance to gefitinib in NSCLC cells with activating mutation of EGFR. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *121*, 82-90. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.04.024

Meng, S., Wang, G., Lu, Y., & Fan, Z. (2018b). Functional cooperation between HIF-1α and c-Jun in mediating primary and acquired resistance to gefitinib in NSCLC cells with activating mutation of EGFR. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *121*, 82-90. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.04.024

Meng, Z., Moroishi, T., & Guan, K.-L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*, *30*(1), 1-17. https://doi.org/10.1101/gad.274027.115

Meng, Z., Qiu, Y., Lin, K. C., Kumar, A., Placone, J. K., Fang, C., Wang, K.-C., Lu, S., Pan, M., Hong, A. W., Moroishi, T., Luo, M., Plouffe, S. W., Diao, Y., Ye, Z., Park, H. W., Wang, X., Yu, F.-X., Chien, S., … Guan, K.-L. (2018). RAP2 Mediates Mechano-responses of Hippo Pathway. *Nature*, *560*(7720), 655-660. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0444-0

Menon, M. B., & Dhamija, S. (2018). Beclin 1 Phosphorylation – at the Center of Autophagy Regulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*. https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00137

Mercer, C. A., Kaliappan, A., & Dennis, P. B. (2009). A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, *5*(5), 649-662. https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8249

Merdzhanova, G., Edmond, V., De Seranno, S., Van den Broeck, A., Corcos, L., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., & Eymin, B. (2008). E2F1 controls alternative splicing pattern of genes involved in apoptosis through upregulation of the splicing factor SC35. *Cell Death & Differentiation*, *15*(12), 1815-1823. https://doi.org/10.1038/cdd.2008.135

Mgrditchian, T., Arakelian, T., Paggetti, J., Noman, M. Z., Viry, E., Moussay, E., Van Moer, K., Kreis, S., Guerin, C., Buart, S., Robert, C., Borg, C., Vielh, P., Chouaib, S., Berchem, G., & Janji, B. (2017). Targeting autophagy inhibits melanoma growth by enhancing NK cells infiltration in a CCL5-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(44), E9271-E9279. https://doi.org/10.1073/pnas.1703921114

Miao, L.-J., Huang, F.-X., Sun, Z.-T., Zhang, R.-X., Huang, S.-F., & Wang, J. (2014). Stat3 inhibits Beclin 1 expression through recruitment of HDAC3 in nonsmall cell lung cancer cells. *Tumour Biology:*

*The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *35*(7), 7097-7103. https://doi.org/10.1007/s13277-014-1961-6

Micalizzi, D. S., Haber, D. A., & Maheswaran, S. (2017). Cancer metastasis through the prism of epithelial-to-mesenchymal transition in circulating tumor cells. *Molecular Oncology*, *11*(7), 770-780. https://doi.org/10.1002/1878-0261.12081

Miller, E., Yang, J., DeRan, M., Wu, C., Su, A. I., Bonamy, G. M. C., Liu, J., Peters, E. C., & Wu, X. (2012). Identification of Serum-Derived Sphingosine-1-Phosphate as a Small Molecule Regulator of YAP. *Chemistry & Biology*, *19*(8), 955-962. https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.07.005

Miranda, M. Z., Bialik, J. F., Speight, P., Dan, Q., Yeung, T., Szászi, K., Pedersen, S. F., & Kapus, A. (2017). TGF-β1 regulates the expression and transcriptional activity of TAZ protein via a Smad3-independent, myocardin-related transcription factor-mediated mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, *292*(36), 14902-14920. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.780502

Mitchell, D., Kwon, H., Kubica, P., Huff, W., O'Regan, R., & Dey, M. (2022). Brain Metastases : An Update on Multi-disciplinary Approach of Clinical Management. *Neuro-Chirurgie*, *68*(1), 69-85. https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2021.04.001

Mitrakas, A. G., Kalamida, D., Giatromanolaki, A., Pouliliou, S., Tsolou, A., Kyranas, R., & Koukourakis, M. I. (2018). Autophagic flux response and glioblastoma sensitivity to radiation. *Cancer Biology & Medicine*, *15*(3), 260-274. https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0173

Mizushima, N. (2007). Autophagy : Process and function. *Genes & Development*, *21*(22), 2861-2873. https://doi.org/10.1101/gad.1599207

Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy : Renovation of Cells and Tissues. *Cell*, *147*(4), 728-741. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026

Mleczak, A., Millar, S., Tooze, S. A., Olson, M. F., & Chan, E. Y. W. (2013). Regulation of autophagosome formation by Rho kinase. *Cellular Signalling*, *25*(1), 1-11. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.09.010

Mo, J., Park, H. W., & Guan, K. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO reports*, *15*(6), 642-656. https://doi.org/10.15252/embr.201438638

Mo, J.-S., Meng, Z., Kim, Y. C., Park, H. W., Hansen, C. G., Kim, S., Lim, D.-S., & Guan, K.-L. (2015). Cellular energy stress induces AMPK-mediated regulation of YAP and the Hippo pathway. *Nature cell biology*, *17*(4), 500-510. https://doi.org/10.1038/ncb3111

Moeller, B. J., Cao, Y., Li, C. Y., & Dewhirst, M. W. (2004). Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors : Role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*, *5*(5), 429-441. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00115-1

Mohseni, M., Sun, J., Lau, A., Curtis, S., Goldsmith, J., Fox, V. L., Wei, C., Frazier, M., Samson, O., Wong, K.-K., Kim, C., & Camargo, F. D. (2014). A genetic screen identifies an LKB1/PAR1 signaling axis controlling the Hippo/YAP pathway. *Nature cell biology*, *16*(1), 108-117. https://doi.org/10.1038/ncb2884

Moleirinho, S., Hoxha, S., Mandati, V., Curtale, G., Troutman, S., Ehmer, U., & Kissil, J. L. (s. d.). Regulation of localization and function of the transcriptional co-activator YAP by angiomotin. *eLife*, *6*, e23966. https://doi.org/10.7554/eLife.23966

Moretti, L., Attia, A., Kim, K. W., & Lu, B. (2007). Crosstalk Between Bak/Bax and mTOR Signaling Regulates Radiation-Induced Autophagy. *Autophagy*, *3*(2), 142-144. https://doi.org/10.4161/auto.3607

Mowers, E. E., Sharifi, M. N., & Macleod, K. F. (2017). Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene*, *36*(12), 1619-1630. https://doi.org/10.1038/onc.2016.333

Mukhopadhyay, S., Mahapatra, K. K., Praharaj, P. P., Patil, S., & Bhutia, S. K. (2022). Recent progress of autophagy signaling in tumor microenvironment and its targeting for possible cancer therapeutics. *Seminars in Cancer Biology*, *85*, 196-208. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2021.09.003

Müller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verástegui, E., & Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, *410*(6824), 50-56. https://doi.org/10.1038/35065016

Nakajima, H., Yamamoto, K., Agarwala, S., Terai, K., Fukui, H., Fukuhara, S., Ando, K., Miyazaki, T., Yokota, Y., Schmelzer, E., Belting, H.-G., Affolter, M., Lecaudey, V., & Mochizuki, N. (2017). Flow-Dependent Endothelial YAP Regulation Contributes to Vessel Maintenance. *Developmental Cell*, *40*(6), 523-536.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.02.019

Nakatogawa, H. (2013). Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays in Biochemistry*, *55*, 39-50. https://doi.org/10.1042/bse0550039

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., & Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms : Lessons from yeast. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *10*(7), 458-467. https://doi.org/10.1038/nrm2708

Narita, M., Young, A. R. J., Arakawa, S., Samarajiwa, S. A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L. S., Reichelt, S., Ferreira, M., Tavaré, S., Inoki, K., Shimizu, S., & Narita, M. (2011). Spatial Coupling of mTOR and Autophagy Augments Secretory Phenotypes. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6032), 966-970. https://doi.org/10.1126/science.1205407

Nazio, F., Bordi, M., Cianfanelli, V., Locatelli, F., & Cecconi, F. (2019). Autophagy and cancer stem cells : Molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell Death and Differentiation*, *26*(4), 690-702. https://doi.org/10.1038/s41418-019-0292-y

Nazio, F., Po, A., Abballe, L., Ballabio, C., Diomedi Camassei, F., Bordi, M., Camera, A., Caruso, S., Caruana, I., Pezzullo, M., Ferraina, C., Milletti, G., Gianesello, M., Reddel, S., De Luca, C. D., Ceglie, D., Marinelli, S., Campello, S., Papaleo, E., … Cecconi, F. (2021). Targeting cancer stem cells in medulloblastoma by inhibiting AMBRA1 dual function in autophagy and STAT3 signalling. *Acta Neuropathologica*, *142*(3), 537-564. https://doi.org/10.1007/s00401-021-02347-7

Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—An evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *11*(3), 220-228. https://doi.org/10.1038/nrm2858

Neman, J., Choy, C., Kowolik, C. M., Anderson, A., Duenas, V. J., Waliany, S., Chen, B. T., Chen, M. Y., & Jandial, R. (2013). Co-evolution of breast-to-brain metastasis and neural progenitor cells. *Clinical & experimental metastasis*, *30*(6), 10.1007/s10585-013-9576-9577. https://doi.org/10.1007/s10585-013-9576-7

Nguyen, D. X., Chiang, A. C., Zhang, X. H. F., Kim, J. Y., Kris, M. G., Ladanyi, M., Gerald, W. L., & Massagué, J. (2009). WNT/TCF signaling through LEF1 and HOXB9 mediates lung adenocarcinoma metastasis. *Cell*, *138*(1), 51-62. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.030

Ni, X., Tao, J., Barbi, J., Chen, Q., Park, B. V., Li, Z., Zhang, N., Lebid, A., Ramaswamy, A., Wei, P., Zheng, Y., Zhang, X., Wu, X., Vignali, P., Yang, C.-P., Li, H., Pardoll, D., Lu, L., Pan, D., & Pan, F. (2018). YAP Is Essential for Treg-Mediated Suppression of Antitumor Immunity. *Cancer Discovery*, *8*(8), 1026-1043. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-1124

Nilsson, J. A., & Cleveland, J. L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene*, *22*(56), 9007-9021. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207261

Nilsson, M. B., Robichaux, J., Herynk, M. H., Cascone, T., Le, X., Elamin, Y., Patel, S., Zhang, F., Xu, L., Hu, L., Diao, L., Shen, L., He, J., Yu, X., Nikolinakos, P., Saintigny, P., Fang, B., Girard, L., Wang, J., … Heymach, J. V. (2021). Altered regulation of HIF-1α in naïve- and drug-resistant EGFR mutant NSCLC : Implications for a VEGFA-dependent phenotype. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, *16*(3), 439-451. https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.11.022

Nisar, H., Sanchidrián González, P. M., Brauny, M., Labonté, F. M., Schmitz, C., Roggan, M. D., Konda, B., & Hellweg, C. E. (2023). Hypoxia Changes Energy Metabolism and Growth Rate in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancers*, *15*(9), 2472. https://doi.org/10.3390/cancers15092472

Nishimura, T., & Tooze, S. A. (2020). Emerging roles of ATG proteins and membrane lipids in autophagosome formation. *Cell Discovery*, *6*, 32. https://doi.org/10.1038/s41421-020-0161-3

Niso-Santano, M., Shen, S., Adjemian, S., Malik, S. A., Mariño, G., Lachkar, S., Senovilla, L., Kepp, O., Galluzzi, L., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2013). Direct interaction between STAT3 and EIF2AK2 controls fatty acid-induced autophagy. *Autophagy*, *9*(3), 415-417. https://doi.org/10.4161/auto.22910

Noda, T. (2017). Autophagy in the context of the cellular membrane-trafficking system : The enigma of Atg9 vesicles. *Biochemical Society Transactions*, *45*(6), 1323-1331. https://doi.org/10.1042/BST20170128

Noman, M. Z., Messai, Y., Muret, J., Hasmim, M., & Chouaib, S. (2014). Crosstalk between CTC, Immune System and Hypoxic Tumor Microenvironment. *Cancer Microenvironment*, *7*(3), 153-160. https://doi.org/10.1007/s12307-014-0157-3

Odintsov, I., & Sholl, L. M. (2024). Prognostic and predictive biomarkers in non-small cell lung carcinoma. *Pathology*, *56*(2), 192-204. https://doi.org/10.1016/j.pathol.2023.11.006

Ohsumi, Y. (2014). Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*, *24*(1), 9-23. https://doi.org/10.1038/cr.2013.169

Olivas, T. J., Wu, Y., Yu, S., Luan, L., Choi, P., Guinn, E. D., Nag, S., De Camilli, P. V., Gupta, K., & Melia, T. J. (2023). ATG9 vesicles comprise the seed membrane of mammalian autophagosomes. *Journal of Cell Biology*, *222*(7), e202208088. https://doi.org/10.1083/jcb.202208088

Orsi, A., Razi, M., Dooley, H. C., Robinson, D., Weston, A. E., Collinson, L. M., & Tooze, S. A. (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(10), 1860-1873. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0746

Ou, S.-C., Bai, K.-J., Cheng, W.-H., Chen, J.-Y., Lin, C.-H., Wen, H.-C., & Chen, B.-C. (2020). TGF-β Induced CTGF Expression in Human Lung Epithelial Cells through ERK, ADAM17, RSK1, and C/EBPβ Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 9084. https://doi.org/10.3390/ijms21239084

Overholtzer, M., Zhang, J., Smolen, G. A., Muir, B., Li, W., Sgroi, D. C., Deng, C.-X., Brugge, J. S., & Haber, D. A. (2006). Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(33), 12405-12410. https://doi.org/10.1073/pnas.0605579103

Palumbo, J. S., Talmage, K. E., Massari, J. V., La Jeunesse, C. M., Flick, M. J., Kombrinck, K. W., Jirousková, M., & Degen, J. L. (2005). Platelets and fibrin(ogen) increase metastatic potential

by impeding natural killer cell–mediated elimination of tumor cells. *Blood*, *105*(1), 178-185. https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2272

Panda, D. K., Bai, X., Zhang, Y., Stylianesis, N. A., Koromilas, A. E., Lipman, M. L., & Karaplis, A. C. (2022). SCF-SKP2 E3 ubiquitin ligase links mTORC1/ER stress/ISR with YAP activation in murine renal cystogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *132*(24), e153943. https://doi.org/10.1172/JCI153943

Papp-Szabó, E., Josephy, P. D., & Coomber, B. L. (2005). Microenvironmental influences on mutagenesis in mammary epithelial cells. *International Journal of Cancer*, *116*(5), 679-685. https://doi.org/10.1002/ijc.21088

Paquette, M., El-Houjeiri, L., C Zirden, L., Puustinen, P., Blanchette, P., Jeong, H., Dejgaard, K., Siegel, P. M., & Pause, A. (2021). AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3. *Autophagy*, *17*(12), 3957-3975. https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1898748

Park, H. S., Lee, D., Kang, D. H., Yeo, M., Bae, G., Lee, D., Yoo, G., Kim, J., Moon, E., Huh, Y. H., Lee, S., Jo, E., Cho, S. Y., Lee, J. E., & Chung, C. (2021). Targeting YAP-p62 signaling axis suppresses the EGFR-TKI-resistant lung adenocarcinoma. *Cancer Medicine*, *10*(4), 1405-1417. https://doi.org/10.1002/cam4.3734

Park, H. W., Kim, Y. C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J.-S., Plouffe, S. W., Meng, Z., Lin, K. C., Yu, F.-X., Alexander, C. M., Wang, C., & Guan, K.-L. (2015). Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell*, *162*(4), 780-794. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.013

Park, J.-M., Seo, M., Jung, C. H., Grunwald, D., Stone, M., Otto, N. M., Toso, E., Ahn, Y., Kyba, M., Griffin, T. J., Higgins, L., & Kim, D.-H. (2018). ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy*, *14*(4), 584-597. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1422851

Park, K., Ju, S., Choi, H., Gao, P., Bang, G., Choi, J. H., Jang, J., Morris, A. J., Kang, B.-H., Hsu, V. W., & Park, S.-Y. (2025). PITPβ promotes COPI vesicle fission through lipid transfer and membrane contact formation. *The Journal of Cell Biology*, *224*(5), e202407166. https://doi.org/10.1083/jcb.202407166

Parks, S. K., Cormerais, Y., Durivault, J., & Pouyssegur, J. (2016). Genetic disruption of the pHi-regulating proteins Na+/H+ exchanger 1 (SLC9A1) and carbonic anhydrase 9 severely reduces growth of colon cancer cells. *Oncotarget*, *8*(6), 10225. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14379

Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An Overview of Autophagy : Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, *20*(3), 460-473. https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371

Patel, S., Wetie, A. G. N., Darie, C. C., & Clarkson, B. D. (2014). Cancer Secretomes and Their Place in Supplementing Other Hallmarks of Cancer. In A. G. Woods & C. C. Darie (Éds.), *Advancements of Mass Spectrometry in Biomedical Research* (p. 409-442). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06068-2_20

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, *122*(6), 927-939. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002

Paul, N. R., Jacquemet, G., & Caswell, P. T. (2015). Endocytic Trafficking of Integrins in Cell Migration. *Current Biology*, *25*(22), R1092-R1105. https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.09.049

Pavel, M., Park, S. J., Frake, R. A., Son, S. M., Manni, M. M., Bento, C. F., Renna, M., Ricketts, T., Menzies, F. M., Tanasa, R., & Rubinsztein, D. C. (2021). α-Catenin levels determine direction of YAP/TAZ response to autophagy perturbation. *Nature Communications*, *12*(1), 1703. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21882-1

Pavel, M., Renna, M., Park, S. J., Menzies, F. M., Ricketts, T., Füllgrabe, J., Ashkenazi, A., Frake, R. A., Lombarte, A. C., Bento, C. F., Franze, K., & Rubinsztein, D. C. (2018). Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. *Nature Communications*, *9*, 2961. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05388-x

Pavel, M., Tanasa, R., Park, S. J., & Rubinsztein, D. C. (2022). The complexity of biological control systems : An autophagy case study. *BioEssays*, *44*(3), 2100224. https://doi.org/10.1002/bies.202100224

Pavlides, S., Whitaker-Menezes ,Diana, Castello-Cros ,Remedios, Flomenberg ,Neal, Witkiewicz ,Agnieszka K., Frank ,Philippe G., Casimiro ,Mathew C., Wang ,Chenguang, Fortina ,Paolo, Addya ,Sankar, Pestell ,Richard G., Martinez-Outschoorn ,Ubaldo E., Sotgia ,Federica, & and Lisanti, M. P. (2009). The reverse Warburg effect : Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle*, *8*(23), 3984-4001. https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238

Peng, Y.-F., Shi, Y.-H., Shen, Y.-H., Ding, Z.-B., Ke, A.-W., Zhou, J., Qiu, S.-J., & Fan, J. (2013). Promoting Colonization in Metastatic HCC Cells by Modulation of Autophagy. *PLoS ONE*, *8*(9), e74407. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074407

Peng, Y.-F., Shi ,Ying-Hong, Ding ,Zhen-Bin, Ke ,Ai-Wu, Gu ,Cheng-Yu, Hui ,Bo, Zhou ,Jian, Qiu ,Shuang-Jian, Dai ,Zhi, & and Fan, J. (2013). Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy*, *9*(12), 2056-2068. https://doi.org/10.4161/auto.26398

Pensa, S., Lloyd-Lewis, B., Sargeant, T. J., Resemann, H. K., Kahn, C. R., & Watson, C. J. (2014). Stat3 and the PI3K regulatory subunits p55α and p50α regulate autophagy in vivo. *The FEBS journal*, *281*(20), 4557-4567. https://doi.org/10.1111/febs.13035

Peske, J. D., Woods, A. B., & Engelhard, V. H. (2015). Control of CD8 T-cell Infiltration into Tumors by Vasculature and Microenvironment. *Advances in cancer research*, *128*, 263-307. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.05.001

Piccolo, S., Dupont, S., & Cordenonsi, M. (2014). The Biology of YAP/TAZ : Hippo Signaling and Beyond. *Physiological Reviews*, *94*(4), 1287-1312. https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014

Piccolo, S., Panciera, T., Contessotto, P., & Cordenonsi, M. (2023). YAP/TAZ as master regulators in cancer – modulation, function and therapeutic approaches. *Nature cancer*, *4*(1), 9-26. https://doi.org/10.1038/s43018-022-00473-z

Pinzón-Daza, M. L., Cuellar-Saenz, Y., Nualart, F., Ondo-Mendez, A., Del Riesgo, L., Castillo-Rivera, F., & Garzón, R. (2017). Oxidative Stress Promotes Doxorubicin-Induced Pgp and BCRP Expression in Colon Cancer Cells Under Hypoxic Conditions. *Journal of Cellular Biochemistry*, *118*(7), 1868-1878. https://doi.org/10.1002/jcb.25890

Placke, T., Örgel, M., Schaller, M., Jung, G., Rammensee, H.-G., Kopp, H.-G., & Salih, H. R. (2012). Platelet-Derived MHC Class I Confers a Pseudonormal Phenotype to Cancer Cells That Subverts the Antitumor Reactivity of Natural Killer Immune Cells. *Cancer Research*, *72*(2), 440-448. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1872

Polson, H. E. J., de Lartigue, J., Rigden, D. J., Reedijk, M., Urbé, S., Clague, M. J., & Tooze, S. A. (2010). Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, *6*(4), 506-522. https://doi.org/10.4161/auto.6.4.11863

Popovic, D., & Dikic, I. (2014). TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO Reports*, *15*(4), 392-401. https://doi.org/10.1002/embr.201337995

Porporato, P. E., Filigheddu, N., Pedro, J. M. B.-S., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2018). Mitochondrial metabolism and cancer. *Cell Research*, *28*(3), 265-280. https://doi.org/10.1038/cr.2017.155

Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Dönnes, P., & Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins : Essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *Journal of Cell Science*, *128*(2), 207-217. https://doi.org/10.1242/jcs.146258

Pu, J., Huang, Y., Fang, Q., Wang, J., Li, W., Xu, Z., Wu, X., Lu, Y., & Wei, H. (2021). Hypoxia-induced Fascin-1 upregulation is regulated by Akt/Rac1 axis and enhances malignant properties of liver cancer cells via mediating actin cytoskeleton rearrangement and Hippo/YAP activation. *Cell Death Discovery*, *7*(1), 385. https://doi.org/10.1038/s41420-021-00778-5

Puente, C., Hendrickson, R. C., & Jiang, X. (2016). Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(11), 6026-6035. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689646

Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., & Strasser, A. (2001). Bmf : A proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5536), 1829-1832. https://doi.org/10.1126/science.1062257

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes : Weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer*, *11*(11), 761-774. https://doi.org/10.1038/nrc3106

Qi, H., Wang, S., Wu, J., Yang, S., Gray, S., Ng, C. S. H., Du, J., Underwood, M. J., Li, M.-Y., & Chen, G. G. (2019). EGFR-AS1/HIF2A regulates the expression of FOXP3 to impact the cancer stemness of smoking-related non-small cell lung cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *11*, 1758835919855228. https://doi.org/10.1177/1758835919855228

Qian, B.-Z., & Pollard, J. W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, *141*(1), 39-51. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.014

Qiang, L., Sample, A., Shea, C. R., Soltani, K., Macleod, K. F., & He, Y.-Y. (2017). Autophagy gene ATG7 regulates ultraviolet radiation-induced inflammation and skin tumorigenesis. *Autophagy*, *13*(12), 2086-2103. https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1380757

Qiang, M., Chen, Z., Liu, H., Dong, J., Gong, K., Zhang, X., Huo, P., Zhu, J., Shao, Y., Ma, J., Zhang, B., Liu, W., & Tang, M. (2025). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in lung cancer : Mechanisms and therapeutic targeting. *Frontiers in Pharmacology*, *16*, 1516583. https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1516583

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., & Levine, B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12), 1809-1820. https://doi.org/10.1172/JCI20039

Rangachari, D., Yamaguchi, N., VanderLaan, P. A., Folch, E., Mahadevan, A., Floyd, S. R., Uhlmann, E. J., Wong, E. T., Dahlberg, S. E., Huberman, M. S., & Costa, D. B. (2015). Brain metastases in patients with EGFR-mutated or ALK-rearranged non-small-cell lung cancers. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *88*(1), 108-111. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.01.020

Rao, S., Tortola, L., Perlot, T., Wirnsberger, G., Novatchkova, M., Nitsch, R., Sykacek, P., Frank, L., Schramek, D., Komnenovic, V., Sigl, V., Aumayr, K., Schmauss, G., Fellner, N., Handschuh, S., Glösmann, M., Pasierbek, P., Schlederer, M., Resch, G. P., … Penninger, J. M. (2014). A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nature Communications*, *5*(1), 3056. https://doi.org/10.1038/ncomms4056

Rauskolb, C., Sun, S., Sun, G., Pan, Y., & Irvine, K. D. (2014). Cytoskeletal Tension inhibits Hippo signaling through an Ajuba-Warts complex. *Cell*, *158*(1), 143-156. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.035

Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., & Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1α. *Genes & Development*, *14*(1), 34-44.

Reeves, M. E., Firek, M., Chen, S.-T., & Amaar, Y. (2013). The RASSF1 Gene and the Opposing Effects of the RASSF1A and RASSF1C Isoforms on Cell Proliferation and Apoptosis. *Molecular Biology International*, *2013*, 145096. https://doi.org/10.1155/2013/145096

Ren, B.-F., Deng, L.-F., Wang, J., Zhu, Y.-P., Wei, L., & Zhou, Q. (2008). Hypoxia regulation of facilitated glucose transporter-1 and glucose transporter-3 in mouse chondrocytes mediated by HIF-1α. *Joint Bone Spine*, *75*(2), 176-181. https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2007.05.012

Ren, J. (2023). Intermittent hypoxia BMSCs-derived exosomal miR-31-5p promotes lung adenocarcinoma development via WDR5-induced epithelial mesenchymal transition. *Sleep and Breathing*, *27*(4), 1399-1409. https://doi.org/10.1007/s11325-022-02737-5

Ren, W., Hou, J., Yang, C., Wang, H., Wu, S., Wu, Y., Zhao, X., & Lu, C. (2019). Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *38*, 62. https://doi.org/10.1186/s13046-019-1027-0

Ren, Y., Cao, L., Wang, L., Zheng, S., Zhang, Q., Guo, X., Li, X., Chen, M., Wu, X., Furlong, F., Meng, Z., & Xu, K. (2021). Autophagic secretion of HMGB1 from cancer-associated fibroblasts promotes metastatic potential of non-small cell lung cancer cells via NFκB signaling. *Cell Death & Disease*, *12*(10), 858. https://doi.org/10.1038/s41419-021-04150-4

Rey, S., & Semenza, G. L. (2010). Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. *Cardiovascular Research*, *86*(2), 236-242. https://doi.org/10.1093/cvr/cvq045

Richter, A. M., Pfeifer, G. P., & Dammann, R. H. (2009). The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1796*(2), 114-128. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.03.004

Rivera-Reyes, A., Ye, S., E. Marino, G., Egolf, S., E. Ciotti, G., Chor, S., Liu, Y., Posimo, J. M., Park, P. M. C., Pak, K., Babichev, Y., Sostre-Colón, J., Tameire, F., Leli, N. M., Koumenis, C., C. Brady, D., Mancuso, A., Weber, K., Gladdy, R., … Eisinger-Mathason, T. S. K. (2018). YAP1 enhances NF-κB-dependent and independent effects on clock-mediated unfolded protein responses and autophagy in sarcoma. *Cell Death & Disease*, *9*(11), 1108. https://doi.org/10.1038/s41419-018-1142-4

Robador, J. R., Feinauer, M. J., Schneider, S. W., Mayer, F. T., Gorzelanny, C., Sacharow, A., Liu, X., Berghoff, A., Brehm, M. A., Hirsch, D., Stadler, J., Vidal-y-Si, S., Wladykowski, E., Asong, M., Nowak, K., Seiz-Rosenhagen, M., Umansky, V., Mess, C., Pantel, K., … Bauer, A. T. (2021).

Involvement of platelet-derived VWF in metastatic growth of melanoma in the brain. *Neuro-oncology Advances*, *3*(1), vdab175. https://doi.org/10.1093/noajnl/vdab175

Robb, G. B., Carson, A. R., Tai, S. C., Fish, J. E., Singh, S., Yamada, T., Scherer, S. W., Nakabayashi, K., & Marsden, P. A. (2004). Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by an Overlapping Antisense mRNA Transcript *. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(36), 37982-37996. https://doi.org/10.1074/jbc.M400271200

Roczniak-Ferguson, A., Petit, C. S., Froehlich, F., Qian, S., Ky, J., Angarola, B., Walther, T. C., & Ferguson, S. M. (2012). The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Science Signaling*, *5*(228), ra42. https://doi.org/10.1126/scisignal.2002790

Roehlecke, C., & Schmidt, M. H. H. (2020). Tunneling Nanotubes and Tumor Microtubes in Cancer. *Cancers*, *12*(4), 857. https://doi.org/10.3390/cancers12040857

Rong, R., Jiang, L. Y., Sheikh, M. S., & Huang, Y. (2007). Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene*, *26*(55), 7700-7708. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210575

Rong, R., Jin, W., Zhang, J., Saeed Sheikh, M., & Huang, Y. (2004). Tumor suppressor RASSF1A is a microtubule-binding protein that stabilizes microtubules and induces G2/M arrest. *Oncogene*, *23*(50), 8216-8230. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207901

Rosell, R., Codony-Servat, J., González, J., Santarpia, M., Jain, A., Shivamallu, C., Wang, Y., Giménez-Capitán, A., Molina-Vila, M. A., Nilsson, J., & González-Cao, M. (2024). KRAS G12C-mutant driven non-small cell lung cancer (NSCLC). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *195*, 104228. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2023.104228

Roşianu, F., Mihaylov, S. R., Eder, N., Martiniuc, A., Claxton, S., Flynn, H. R., Jalal, S., Domart, M.-C., Collinson, L., Skehel, M., Snijders, A. P., Krause, M., Tooze, S. A., & Ultanir, S. K. (2023). Loss of NDR1/2 kinases impairs endomembrane trafficking and autophagy leading to neurodegeneration. *Life Science Alliance*, *6*(2). https://doi.org/10.26508/lsa.202201712

Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, *79*, 34-74. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.11.002

Rouschop, K. M. A., Beucken, T. van den, Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkouls, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J. W., Lambin, P., Kogel, A. J. van der, Koritzinsky, M., & Wouters, B. G. (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes *MAP1LC3B* and *ATG5*. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(1), 127-141. https://doi.org/10.1172/JCI40027

Roy, B. C., Kohno, T., Iwakawa, R., Moriguchi, T., Kiyono, T., Morishita, K., Sanchez-Cespedes, M., Akiyama, T., & Yokota, J. (2010). Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, *70*(2), 136-145. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.02.004

Russell, R. C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H. W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T. P., Dillin, A., & Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature Cell Biology*, *15*(7), 741-750. https://doi.org/10.1038/ncb2757

Ryu, H. Y., Kim, L. E., Jeong, H., Yeo, B. K., Lee, J.-W., Nam, H., Ha, S., An, H.-K., Park, H., Jung, S., Chung, K. M., Kim, J., Lee, B.-H., Cheong, H., Kim, E.-K., & Yu, S.-W. (2021). GSK3B induces autophagy by phosphorylating ULK1. *Experimental & Molecular Medicine*, *53*(3), 369-383. https://doi.org/10.1038/s12276-021-00570-6

Sabine, A., Bovay, E., Demir, C. S., Kimura, W., Jaquet, M., Agalarov, Y., Zangger, N., Scallan, J. P., Graber, W., Gulpinar, E., Kwak, B. R., Mäkinen, T., Martinez-Corral, I., Ortega, S., Delorenzi, M., Kiefer, F., Davis, M. J., Djonov, V., Miura, N., & Petrova, T. V. (2015). FOXC2 and fluid shear stress stabilize postnatal lymphatic vasculature. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(10), 3861-3877. https://doi.org/10.1172/JCI80454

Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., & Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Developmental Cell*, *20*(1), 131-139. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003

Saintigny, P., & Burger, J. A. (2012). Recent advances in non-small cell lung cancer biology and clinical management. *Discovery Medicine..*, *13*(71), 287-297.

Sakata, K., Kwok, T. T., Murphy, B. J., Laderoute, K. R., Gordon, G. R., & Sutherland, R. M. (1991). Hypoxia-induced drug resistance : Comparison to P-glycoprotein-associated drug resistance. *British Journal of Cancer*, *64*(5), 809-814. https://doi.org/10.1038/bjc.1991.405

Salem, A., Asselin, M.-C., Reymen, B., Jackson, A., Lambin, P., West, C. M. L., O'Connor, J. P. B., & Faivre-Finn, C. (2018). Targeting Hypoxia to Improve Non-Small Cell Lung Cancer Outcome. *Journal of the National Cancer Institute*, *110*(1). https://doi.org/10.1093/jnci/djx160

Salon, C., Eymin, B., Micheau, O., Chaperot, L., Plumas, J., Brambilla, C., Brambilla, E., & Gazzeri, S. (2006). E2F1 induces apoptosis and sensitizes human lung adenocarcinoma cells to death-receptor-mediated apoptosis through specific downregulation of c-FLIPshort. *Cell Death & Differentiation*, *13*(2), 260-272. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401739

Sanaei, M.-J., Razi, S., Pourbagheri-Sigaroodi, A., & Bashash, D. (2022). The PI3K/Akt/mTOR pathway in lung cancer; oncogenic alterations, therapeutic opportunities, challenges, and a glance at the application of nanoparticles. *Translational Oncology*, *18*, 101364. https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101364

Sandilands, E., Serrels, B., McEwan, D. G., Morton, J. P., Macagno, J. P., McLeod, K., Stevens, C., Brunton, V. G., Langdon, W. Y., Vidal, M., Sansom, O. J., Dikic, I., Wilkinson, S., & Frame, M. C. (2012). Autophagic targeting of Src promotes cancer cell survival following reduced FAK signalling. *Nature Cell Biology*, *14*(1), 51-60. https://doi.org/10.1038/ncb2386

Sandilands, E., Serrels, B., Wilkinson, S., & Frame, M. C. (2012). Src-dependent autophagic degradation of Ret in FAK-signalling-defective cancer cells. *EMBO Reports*, *13*(8), 733-740. https://doi.org/10.1038/embor.2012.92

Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D. L., Valenza, M., Gennarino, V. A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R. S., Banfi, S., Parenti, G., Cattaneo, E., & Ballabio, A. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science (New York, N.Y.)*, *325*(5939), 473-477. https://doi.org/10.1126/science.1174447

Sasaki, K., Toide, M., Adachi, T., Morishita, F., Watanabe, Y., Sakurai, H. T., Wakabayashi, S., Kusumi, S., Yamaji, T., Sakurai, K., Koga, D., Hanada, K., Yohda, M., & Yoshida, H. (2025). Dysregulation of PI4P in the trans Golgi regions activates the mammalian Golgi stress response. *The Journal of Biological Chemistry*, *301*(1), 108075. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.108075

Schofield, C. J., & Ratcliffe, P. J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(5), 343-354. https://doi.org/10.1038/nrm1366

Seike, T., Fujita, K., Yamakawa, Y., Kido, M. A., Takiguchi, S., Teramoto, N., Iguchi, H., & Noda, M. (2011). Interaction between lung cancer cells and astrocytes via specific inflammatory cytokines in the

microenvironment of brain metastasis. *Clinical & Experimental Metastasis*, *28*(1), 13-25. https://doi.org/10.1007/s10585-010-9354-8

Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, *3*(10), 721-732. https://doi.org/10.1038/nrc1187

Semenza, G. L. (2004). Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell*, *5*(5), 405-406. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00118-7

Semenza, G. L. (2010). Defining the Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Cancer Biology and Therapeutics. *Oncogene*, *29*(5), 625-634. https://doi.org/10.1038/onc.2009.441

Semenza, G. L. (2013). HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(9), 3664-3671. https://doi.org/10.1172/JCI67230

Semenza, G. L. (2017). Hypoxia-inducible factors : Coupling glucose metabolism and redox regulation with induction of the breast cancer stem cell phenotype. *The EMBO Journal*, *36*(3), 252-259. https://doi.org/10.15252/embj.201695204

Semenza, G. L., Jiang, B.-H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J.-P., Maire, P., & Giallongo, A. (1996). Hypoxia Response Elements in the Aldolase A, Enolase 1, and Lactate Dehydrogenase A Gene Promoters Contain Essential Binding Sites for Hypoxia-inducible Factor 1 *. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(51), 32529-32537. https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32529

Seo, S. H., Hwang, S., Hwang, S., Han, S., Park, H., Lee, Y., Rho, S. B., & Kwon, Y. (2022). Hypoxia-induced ELF3 promotes tumor angiogenesis through IGF1/IGF1R. *EMBO Reports*, *23*(8), e52977. https://doi.org/10.15252/embr.202152977

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V. A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S. U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D. C., & Ballabio, A. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, *332*(6036), 1429-1433. https://doi.org/10.1126/science.1204592

Sha, Y., Rao, L., Settembre, C., Ballabio, A., & Eissa, N. T. (2017). STUB1 regulates TFEB-induced autophagy-lysosome pathway. *The EMBO Journal*, *36*(17), 2544-2552. https://doi.org/10.15252/embj.201796699

Shang, S., Wang, M., Xing, Z., He, N., & Li, S. (2022). Lactate regulators contribute to tumor microenvironment and predict prognosis in lung adenocarcinoma. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1024925. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1024925

Shao, D., Zhai, P., Del Re, D. P., Sciarretta, S., Yabuta, N., Nojima, H., Lim, D.-S., Pan, D., & Sadoshima, J. (2014). A Functional Interaction between Hippo-YAP Signaling and FoxO1 Mediates the Oxidative Stress Response. *Nature communications*, *5*, 3315. https://doi.org/10.1038/ncomms4315

Sharif, T., Martell ,Emma, Dai ,Cathleen, Kennedy ,Barry E., Murphy ,Patrick, Clements ,Derek R., Kim ,Youra, Lee ,Patrick W. K., & and Gujar, S. A. (2017). Autophagic homeostasis is required for the pluripotency of cancer stem cells. *Autophagy*, *13*(2), 264-284. https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1260808

Sharifi, M. N., Mowers, E. E., Drake, L. E., Collier, C., Chen, H., Zamora, M., Mui, S., & Macleod, K. F. (2016). Autophagy promotes focal adhesion disassembly and cell motility of metastatic tumor cells through the direct interaction of paxillin with LC3. *Cell reports*, *15*(8), 1660-1672. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.065

Sharma, K., Goehe, R. W., Di, X., Mark Anthony Hicks, I. I., Torti, S. V., Torti, F. M., Harada, H., & Gewirtz, D. A. (2015). A novel cytostatic form of autophagy in sensitization of non-small cell lung cancer

cells to radiation by vitamin D and the vitamin D analog, EB 1089. *Autophagy*, *10*(12), 2346. https://doi.org/10.4161/15548627.2014.993283

Shi, S., Ou, X., Liu, C., Wen, H., & Ke, J. (2025). Research progress of HIF-1a on immunotherapy outcomes in immune vascular microenvironment. *Frontiers in Immunology*, *16*, 1549276. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1549276

Shi, S., Tan, P., Yan, B., Gao, R., Zhao, J., Wang, J., Guo, J., Li, N., & Ma, Z. (2016). ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells. *Oncology Reports*, *35*(5), 2606-2614. https://doi.org/10.3892/or.2016.4680

Shin, D. H., Jo, J. Y., Kim, S. H., Choi, M., Han, C., Choi, B. K., & Kim, S. S. (2020). Midkine Is a Potential Therapeutic Target of Tumorigenesis, Angiogenesis, and Metastasis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers*, *12*(9), 2402. https://doi.org/10.3390/cancers12092402

Shin, H.-J. R., Kim, H., Oh, S., Lee, J.-G., Kee, M., Ko, H.-J., Kweon, M.-N., Won, K.-J., & Baek, S. H. (2016). AMPK–SKP2–CARM1 signalling cascade in transcriptional regulation of autophagy. *Nature*, *534*(7608), 553-557. https://doi.org/10.1038/nature18014

Shin, J.-Y., Lim, H.-T., Minai-Tehrani, A., Noh, M.-S., Kim, J.-E., Kim, J.-H., Jiang, H.-L., Arote, R., Kim, D.-Y., Chae, C., Lee, K.-H., Kim, M.-S., & Cho, M.-H. (2012). Aerosol delivery of beclin1 enhanced the anti-tumor effect of radiation in the lungs of K-rasLA1 mice. *Journal of Radiation Research*, *53*(4), 506-515. https://doi.org/10.1093/jrr/rrs005

Shivakumar, L., Minna, J., Sakamaki, T., Pestell, R., & White, M. A. (2002). The RASSF1A Tumor Suppressor Blocks Cell Cycle Progression and Inhibits Cyclin D1 Accumulation. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(12), 4309-4318. https://doi.org/10.1128/MCB.22.12.4309-4318.2002

Shrestha, B. K., Skytte Rasmussen, M., Abudu, Y. P., Bruun, J.-A., Larsen, K. B., Alemu, E. A., Sjøttem, E., Lamark, T., & Johansen, T. (2020). NIMA-related kinase 9–mediated phosphorylation of the microtubule-associated LC3B protein at Thr-50 suppresses selective autophagy of p62/sequestosome 1. *The Journal of Biological Chemistry*, *295*(5), 1240-1260. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010068

Singh, K., Pruski, M. A., Polireddy, K., Jones, N. C., Chen, Q., Yao, J., Dar, W. A., McAllister, F., Ju, C., Eltzschig, H. K., Younes, M., Moran, C., Karmouty-Quintana, H., Ying, H., & Bailey, J. M. (2020). Mst1/2 kinases restrain transformation in a novel transgenic model of Ras driven non-small cell lung cancer. *Oncogene*, *39*(5), 1152-1164. https://doi.org/10.1038/s41388-019-1031-z

Skouloudaki, K., Puetz, M., Simons, M., Courbard, J.-R., Boehlke, C., Hartleben, B., Engel, C., Moeller, M. J., Englert, C., Bollig, F., Schäfer, T., Ramachandran, H., Mlodzik, M., Huber, T. B., Kuehn, E. W., Kim, E., Kramer-Zucker, A., & Walz, G. (2009). Scribble participates in Hippo signaling and is required for normal zebrafish pronephros development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(21), 8579-8584. https://doi.org/10.1073/pnas.0811691106

Slobodkin, M. R., & Elazar, Z. (2013). The Atg8 family : Multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays in Biochemistry*, *55*, 51-64. https://doi.org/10.1042/bse0550051

Song, M. S., Song, S. J., Kim, S. J., Nakayama, K., Nakayama, K. I., & Lim, D.-S. (2008). Skp2 regulates the antiproliferative function of the tumor suppressor RASSF1A via ubiquitin-mediated degradation at the G1-S transition. *Oncogene*, *27*(22), 3176-3185. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210971

Song, Q., Mao, B., Cheng, J., Gao, Y., Jiang, K., Chen, J., Yuan, Z., & Meng, S. (2015). YAP Enhances Autophagic Flux to Promote Breast Cancer Cell Survival in Response to Nutrient Deprivation. *PLoS ONE*, *10*(3), e0120790. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120790

Song, S., Ajani, J. A., Honjo, S., Maru, D. M., Chen, Q., Scott, A. W., Heallen, T. R., Xiao, L., Hofstetter, W. L., Weston, B., Lee, J. H., Wadhwa, R., Sudo, K., Stroehlein, J. R., Martin, J. F., Hung, M.-C., & Johnson, R. L. (2014). Hippo coactivator YAP1 upregulates SOX9 and endows stem-like properties to esophageal cancer cells. *Cancer research*, *74*(15), 4170-4182. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3569

Song, S. J., Song, M. S., Kim, S. J., Kim, S. Y., Kwon, S. H., Kim, J. G., Calvisi, D. F., Kang, D., & Lim, D.-S. (2009). Aurora A regulates prometaphase progression by inhibiting the ability of RASSF1A to suppress APC-Cdc20 activity. *Cancer Research*, *69*(6), 2314-2323. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3984

Sorrentino, G., Ruggeri, N., Specchia, V., Cordenonsi, M., Mano, M., Dupont, S., Manfrin, A., Ingallina, E., Sommaggio, R., Piazza, S., Rosato, A., Piccolo, S., & Del Sal, G. (2014). Metabolic control of YAP and TAZ by the mevalonate pathway. *Nature Cell Biology*, *16*(4), 357-366. https://doi.org/10.1038/ncb2936

Sorrentino, G., Ruggeri, N., Zannini, A., Ingallina, E., Bertolio, R., Marotta, C., Neri, C., Cappuzzello, E., Forcato, M., Rosato, A., Mano, M., Bicciato, S., & Del Sal, G. (2017). Glucocorticoid receptor signalling activates YAP in breast cancer. *Nature Communications*, *8*(1), 14073. https://doi.org/10.1038/ncomms14073

Sosa, M. S., Bragado, P., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy : An awakening field. *Nature reviews. Cancer*, *14*(9), 611-622. https://doi.org/10.1038/nrc3793

Souza, V. G. P., de Araújo, R. P., Santesso, M. R., Seneda, A. L., Minutentag, I. W., Felix, T. F., Hamamoto Filho, P. T., Pewarchuk, M. E., Brockley, L. J., Marchi, F. A., Lam, W. L., Drigo, S. A., & Reis, P. P. (2023). Advances in the Molecular Landscape of Lung Cancer Brain Metastasis. *Cancers*, *15*(3), 722. https://doi.org/10.3390/cancers15030722

Spagnolo, C. C., Ciappina, G., Giovannetti, E., Squeri, A., Granata, B., Lazzari, C., Pretelli, G., Pasello, G., & Santarpia, M. (2023). Targeting MET in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) : A New Old Story? *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(12), 10119. https://doi.org/10.3390/ijms241210119

Stampouloglou, E., Cheng, N., Federico, A., Slaby, E., Monti, S., Szeto, G. L., & Varelas, X. (2020). Yap suppresses T-cell function and infiltration in the tumor microenvironment. *PLOS Biology*, *18*(1), e3000591. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000591

Stegert, M. R., Hergovich, A., Tamaskovic, R., Bichsel, S. J., & Hemmings, B. A. (2005). Regulation of NDR Protein Kinase by Hydrophobic Motif Phosphorylation Mediated by the Mammalian Ste20-Like Kinase MST3. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(24), 11019-11029. https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.11019-11029.2005

Steinbichler, T. B., Dudás, J., Riechelmann, H., & Skvortsova, I.-I. (2017). The role of exosomes in cancer metastasis. *Seminars in Cancer Biology*, *44*, 170-181. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.02.006

Stremitzer, S., Berghoff, A., Volz, N., Zhang, W., Yang, D., Stintzing, S., Ning, Y., Sunakawa, Y., Yamauchi, S., Sebio, A., Matsusaka, S., Okazaki, S., Hanna, D., Parekh, A., Mendez, A., Berger, M., El-Khoueiry, R., Birner, P., Preusser, M., & Lenz, H.-J. (2017). Genetic variants associated with colorectal brain metastases susceptibility and survival. *The pharmacogenomics journal*, *17*(1), 29-35. https://doi.org/10.1038/tpj.2015.86

Strohecker, A. M., Guo, J. Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S. M., Chen, G. J., Mathew, R., McMahon, M., & White, E. (2013a). Autophagy Sustains Mitochondrial Glutamine Metabolism and Growth of

BRAFV600E–Driven Lung Tumors. *Cancer discovery*, *3*(11), 10.1158/2159-8290.CD-13-0397. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0397

Strohecker, A. M., Guo, J. Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S. M., Chen, G. J., Mathew, R., McMahon, M., & White, E. (2013b). Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discovery*, *3*(11), 1272-1285. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0397

Sun, Q., Westphal, W., Wong, K. N., Tan, I., & Zhong, Q. (2010). Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(45), 19338-19343. https://doi.org/10.1073/pnas.1010554107

Sun, T., Li, X., Zhang, P., Chen, W.-D., Zhang, H., Li, D.-D., Deng, R., Qian, X.-J., Jiao, L., Ji, J., Li, Y.-T., Wu, R.-Y., Yu, Y., Feng, G.-K., & Zhu, X.-F. (2015). Acetylation of Beclin 1 inhibits autophagosome maturation and promotes tumour growth. *Nature Communications*, *6*(1), 7215. https://doi.org/10.1038/ncomms8215

Sun, T., Peng, H., Mao, W., Ma, L., Liu, H., Mai, J., & Jiao, L. (2021). Autophagy-mediated negative feedback attenuates the oncogenic activity of YAP in pancreatic cancer. *International Journal of Biological Sciences*, *17*(13), 3634-3645. https://doi.org/10.7150/ijbs.61795

Suwa, T., Kobayashi, M., Shirai, Y., Nam, J.-M., Tabuchi, Y., Takeda, N., Akamatsu, S., Ogawa, O., Mizowaki, T., Hammond, E. M., & Harada, H. (s. d.). SPINK1 as a plasma marker for tumor hypoxia and a therapeutic target for radiosensitization. *JCI Insight*, *6*(21), e148135. https://doi.org/10.1172/jci.insight.148135

Swinson, D. E. B., & O'Byrne, K. J. (2006). Interactions Between Hypoxia and Epidermal Growth Factor Receptor in Non–Small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*, *7*(4), 250-256. https://doi.org/10.3816/CLC.2006.n.002

Swords, S., Jia, N., Norris, A., Modi, J., Cai, Q., & Grant, B. D. (2023). A Conserved Requirement for RME-8/DNAJC13 in Neuronal Autolysosome Reformation. *bioRxiv*, 2023.02.27.530319. https://doi.org/10.1101/2023.02.27.530319

Szymaniak, A. D., Mahoney, J. E., Cardoso, W. V., & Varelas, X. (2015). Crumbs3-Mediated Polarity Directs Airway Epithelial Cell Fate through the Hippo Pathway Effector Yap. *Developmental Cell*, *34*(3), 283-296. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.020

Tai, W.-T., Shiau, C.-W., Chen, H.-L., Liu, C.-Y., Lin, C.-S., Cheng, A.-L., Chen, P.-J., & Chen, K.-F. (2013). Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*, *4*(2), e485. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.18

Takacova, M., Kajanova, I., Kolarcikova, M., Lapinova, J., Zatovicova, M., & Pastorekova, S. (2021). Understanding metabolic alterations and heterogeneity in cancer progression through validated immunodetection of key molecular components : A case of carbonic anhydrase IX. *Cancer and Metastasis Reviews*, *40*(4), 1035-1053. https://doi.org/10.1007/s10555-021-10011-5

Takagi, S., Sato, S., Oh-hara, T., Takami, M., Koike, S., Mishima, Y., Hatake, K., & Fujita, N. (2013). Platelets Promote Tumor Growth and Metastasis via Direct Interaction between Aggrus/Podoplanin and CLEC-2. *PLOS ONE*, *8*(8), e73609. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073609

Takahashi, Y., He, H., Tang, Z., Hattori, T., Liu, Y., Young, M. M., Serfass, J. M., Chen, L., Gebru, M., Chen, C., Wills, C. A., Atkinson, J. M., Chen, H., Abraham, T., & Wang, H.-G. (2018). An autophagy

assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nature Communications*, *9*(1), 2855. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05254-w

Takahashi, Y., Liang, X., Hattori, T., Tang, Z., He, H., Chen, H., Liu, X., Abraham, T., Imamura-Kawasawa, Y., Buchkovich, N. J., Young, M. M., & Wang, H.-G. (2019). VPS37A directs ESCRT recruitment for phagophore closure. *The Journal of Cell Biology*, *218*(10), 3336-3354. https://doi.org/10.1083/jcb.201902170

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., & Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & Development*, *25*(8), 795-800. https://doi.org/10.1101/gad.2016211

Tan, A. C., Itchins, M., & Khasraw, M. (2020). Brain Metastases in Lung Cancers with Emerging Targetable Fusion Drivers. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(4), 1416. https://doi.org/10.3390/ijms21041416

Tanaka, K., Osada, H., Murakami-Tonami, Y., Horio, Y., Hida, T., & Sekido, Y. (2017). Statin suppresses Hippo pathway-inactivated malignant mesothelioma cells and blocks the YAP/CD44 growth stimulatory axis. *Cancer Letters*, *385*, 215-224. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.020

Tang, D., Kang, R., Livesey, K. M., Cheh, C.-W., Farkas, A., Loughran, P., Hoppe, G., Bianchi, M. E., Tracey, K. J., Zeh, H. J., III, & Lotze, M. T. (2010). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *Journal of Cell Biology*, *190*(5), 881-892. https://doi.org/10.1083/jcb.200911078

Tang, F., Gao, R., Jeevan-Raj, B., Wyss, C. B., Kalathur, R. K. R., Piscuoglio, S., Ng, C. K. Y., Hindupur, S. K., Nuciforo, S., Dazert, E., Bock, T., Song, S., Buechel, D., Morini, M. F., Hergovich, A., Matthias, P., Lim, D.-S., Terracciano, L. M., Heim, M. H., … Christofori, G. (2019). LATS1 but not LATS2 represses autophagy by a kinase-independent scaffold function. *Nature Communications*, *10*(1), 5755. https://doi.org/10.1038/s41467-019-13591-7

Tang, Y.-A., Chen, Y., Bao, Y., Mahara, S., Yatim, S. M. J. M., Oguz, G., Lee, P. L., Feng, M., Cai, Y., Tan, E. Y., Fong, S. S., Yang, Z., Lan, P., Wu, X., & Yu, Q. (2018). Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1α and TGF-β2 to promote chemoresistance in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(26), E5990-E5999. https://doi.org/10.1073/pnas.1801348115

Tekirdag, K., & Cuervo, A. M. (2018). Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy : Joint by a chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(15), 5414-5424. https://doi.org/10.1074/jbc.R117.818237

Telarovic, I., Wenger, R. H., & Pruschy, M. (2021). Interfering with Tumor Hypoxia for Radiotherapy Optimization. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *40*, 197. https://doi.org/10.1186/s13046-021-02000-x

Thomlinson, R. H., & Gray, L. H. (1955). The Histological Structure of Some Human Lung Cancers and the Possible Implications for Radiotherapy. *British Journal of Cancer*, *9*(4), 539-549. https://doi.org/10.1038/bjc.1955.55

Tian, Y., Kuo, C. -f, Sir, D., Wang, L., Govindarajan, S., Petrovic, L. M., & Ou, J. -h J. (2015). Autophagy inhibits oxidative stress and tumor suppressors to exert its dual effect on hepatocarcinogenesis. *Cell Death & Differentiation*, *22*(6), 1025-1034. https://doi.org/10.1038/cdd.2014.201

Tian, Y., Zhao, L., Gui, Z., Liu, S., Liu, C., Yu, T., & Zhang, L. (2023). PI3K/AKT signaling activates HIF1α to modulate the biological effects of invasive breast cancer with microcalcification. *Npj Breast Cancer*, *9*(1), 93. https://doi.org/10.1038/s41523-023-00598-z

Timón-Gómez, A., & Barrientos, A. (2020). Mitochondrial respiratory chain composition and organization in response to changing oxygen levels. *Journal of life sciences (Westlake Village, Calif.)*, *2*(2), 10.36069/JoLS/20200601. https://doi.org/10.36069/JoLS/20200601

Totaro, A., Zhuang, Q., Panciera, T., Battilana, G., Azzolin, L., Brumana, G., Gandin, A., Brusatin, G., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2019). Cell phenotypic plasticity requires autophagic flux driven by YAP/TAZ mechanotransduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(36), 17848-17857. https://doi.org/10.1073/pnas.1908228116

Tóth, M., Wan, S., Schmitt, J., Birner, P., Wei, T., von Bubnoff, F., de la Torre, C., Thomann, S., Pinna, F., Schirmacher, P., Weiler, S. M. E., & Breuhahn, K. (2025). The Cell Polarity Protein MPP5/PALS1 Controls the Subcellular Localization of the Oncogenes YAP and TAZ in Liver Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *26*(2), 660. https://doi.org/10.3390/ijms26020660

Treps, L., Perret, R., Edmond, S., Ricard, D., & Gavard, J. (2017). Glioblastoma stem-like cells secrete the pro-angiogenic VEGFA factor in extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *6*(1), 1359479. https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1359479

Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Letters*, *333*(1-2), 169-174. https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E

Tuy, K., Rickenbacker, L., & Hjelmeland, A. B. (2021). Reactive oxygen species produced by altered tumor metabolism impacts cancer stem cell maintenance. *Redox Biology*, *44*, 101953. https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101953

Ulbricht, A., Eppler, F. J., Tapia, V. E., van der Ven, P. F. M., Hampe, N., Hersch, N., Vakeel, P., Stadel, D., Haas, A., Saftig, P., Behrends, C., Fürst, D. O., Volkmer, R., Hoffmann, B., Kolanus, W., & Höhfeld, J. (2013). Cellular Mechanotransduction Relies on Tension-Induced and Chaperone-Assisted Autophagy. *Current Biology*, *23*(5), 430-435. https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.064

Unruh, A., Ressel, A., Mohamed, H. G., Johnson, R. S., Nadrowitz, R., Richter, E., Katschinski, D. M., & Wenger, R. H. (2003). The hypoxia-inducible factor-1α is a negative factor for tumor therapy. *Oncogene*, *22*(21), 3213-3220. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206385

Vajdic, C. M., & van Leeuwen, M. T. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *International Journal of Cancer*, *125*(8), 1747-1754. https://doi.org/10.1002/ijc.24439

Valiente, M., Obenauf, A. C., Jin, X., Chen, Q., Zhang, X. H.-F., Lee, D. J., Chaft, J. E., Kris, M. G., Huse, J. T., Brogi, E., & Massagué, J. (2014). Serpins Promote Cancer Cell Survival and Vascular Cooption in Brain Metastasis. *Cell*, *156*(5), 1002-1016. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.040

van der Vaart, A., Griffith, J., & Reggiori, F. (2010). Exit from the Golgi Is Required for the Expansion of the Autophagosomal Phagophore in Yeast Saccharomyces cerevisiae. *Molecular Biology of the Cell*, *21*(13), 2270-2284. https://doi.org/10.1091/mbc.E09-04-0345

Van Egeren, D., Kohli, K., Warner, J. L., Bedard, P. L., Riely, G., Lepisto, E., Schrag, D., LeNoue-Newton, M., Catalano, P., Kehl, K. L., & Michor, F. (2022). Genomic analysis of early-stage lung cancer reveals a role for TP53 mutations in distant metastasis. *Scientific Reports*, *12*(1), 19055. https://doi.org/10.1038/s41598-022-21448-1

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect : The metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5930), 1029-1033. https://doi.org/10.1126/science.1160809

van Uden, P., Kenneth, N. S., Webster, R., Müller, H. A., Mudie, S., & Rocha, S. (2011). Evolutionary Conserved Regulation of HIF-1β by NF-κB. *PLoS Genetics*, *7*(1), e1001285. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001285

van Vliet, A. R., Jefferies, H. B. J., Faull, P. A., Chadwick, J., Ibrahim, F., Skehel, M. J., & Tooze, S. A. (2024). Exploring the ATG9A interactome uncovers interaction with VPS13A. *Journal of Cell Science*, *137*(4), jcs261081. https://doi.org/10.1242/jcs.261081

Vaupel, P. (1977). Hypoxia in neoplastic tissue. *Microvascular Research*, *13*(3), 399-408. https://doi.org/10.1016/0026-2862(77)90106-6

Vaupel, P. (2004). The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The Oncologist*, *9 Suppl 5*, 10-17. https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-90005-10

Vaupel, P., Kallinowski, F., & Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors : A review. *Cancer Research*, *49*(23), 6449-6465.

Verduzco, D., Lloyd, M., Xu, L., Ibrahim-Hashim, A., Balagurunathan, Y., Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2015). Intermittent Hypoxia Selects for Genotypes and Phenotypes That Increase Survival, Invasion, and Therapy Resistance. *PLoS ONE*, *10*(3), e0120958. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120958

Viard-Leveugle, I., Bullani, R. R., Meda, P., Micheau, O., Limat, A., Saurat, J.-H., Tschopp, J., & French, L. E. (2003). Intracellular localization of keratinocyte Fas ligand explains lack of cytolytic activity under physiological conditions. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(18), 16183-16188. https://doi.org/10.1074/jbc.M212188200

Vietri, M., Radulovic, M., & Stenmark, H. (2020). The many functions of ESCRTs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(1), 25-42. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0177-4

Vliet, A. R. van, Chiduza, G. N., Maslen, S. L., Pye, V. E., Joshi, D., Tito, S. D., Jefferies, H. B. J., Christodoulou, E., Roustan, C., Punch, E., Hervás, J. H., O'Reilly, N., Skehel, J. M., Cherepanov, P., & Tooze, S. A. (2022). ATG9A and ATG2A form a heteromeric complex essential for autophagosome formation. *Molecular Cell*, *82*(22), 4324-4339.e8. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.10.017

Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., & Kinzler, K. W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6127), 1546-1558. https://doi.org/10.1126/science.1235122

Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., & Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*, *138*(18), 3907-3914. https://doi.org/10.1242/dev.070987

Wan, J., & Wu, W. (2016). Hyperthermia induced HIF-1a expression of lung cancer through AKT and ERK signaling pathways. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *35*, 119. https://doi.org/10.1186/s13046-016-0399-7

Wang, A., Fan, F., Zang, C., Li, C., Hong, H., Wang, Z., Gao, Y., Chen, L., Yu, X., Zhou, C., & Zhao, C. (2023). MPZL1 Promotes Lung Adenocarcinoma Progression by Enhancing Tumor Proliferation, Invasion, Migration, and Suppressing Immune Function via Transforming Growth Factor-β1. *Human Gene Therapy*, *34*(11-12), 540-553. https://doi.org/10.1089/hum.2022.234

Wang, C., Xu, S., & Yang, X. (2024). Hypoxia-Driven Changes in Tumor Microenvironment : Insights into Exosome-Mediated Cell Interactions. *International Journal of Nanomedicine*, *19*, 8211-8236. https://doi.org/10.2147/IJN.S479533

Wang, C.-Z., Yan, G.-X., Dong, D.-S., Xin, H., & Liu, Z.-Y. (2019). LncRNA-ATB promotes autophagy by activating Yes-associated protein and inducing autophagy-related protein 5 expression in

hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, *25*(35), 5310-5322. https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i35.5310

Wang, H., Sun, H.-Q., Zhu, X., Zhang, L., Albanesi, J., Levine, B., & Yin, H. (2015). GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(22), 7015-7020. https://doi.org/10.1073/pnas.1507263112

Wang, H., Wang, Z., Zhang, G., Zhang, M., Zhang, X., Li, H., Zheng, X., & Ma, Z. (2020). Driver genes as predictive indicators of brain metastasis in patients with advanced NSCLC : EGFR, ALK, and RET gene mutations. *Cancer Medicine*, *9*(2), 487-495. https://doi.org/10.1002/cam4.2706

Wang, H., Zhang, Y., Wu, Q., Wang, Y.-B., & Wang, W. (2018). miR-16 mimics inhibit TGF-β1-induced epithelial-to-mesenchymal transition via activation of autophagy in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncology Reports*, *39*(1), 247-254. https://doi.org/10.3892/or.2017.6088

Wang, J., Liu, D., Sun, Z., Ye, T., Li, J., Zeng, B., Zhao, Q., & Rosie Xing, H. (2021). Autophagy augments the self-renewal of lung cancer stem cells by the degradation of ubiquitinated p53. *Cell Death & Disease*, *12*(1), 1-12. https://doi.org/10.1038/s41419-021-03392-6

Wang, K.-C., Yeh, Y.-T., Nguyen, P., Limqueco, E., Lopez, J., Thorossian, S., Guan, K.-L., Li, Y.-S. J., & Chien, S. (2016). Flow-dependent YAP/TAZ activities regulate endothelial phenotypes and atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(41), 11525-11530. https://doi.org/10.1073/pnas.1613121113

Wang, L., Luo, J.-Y., Li, B., Tian, X. Y., Chen, L.-J., Huang, Y., Liu, J., Deng, D., Lau, C. W., Wan, S., Ai, D., Mak, K.-L. K., Tong, K. K., Kwan, K. M., Wang, N., Chiu, J.-J., Zhu, Y., & Huang, Y. (2016). Integrin-YAP/TAZ-JNK cascade mediates atheroprotective effect of unidirectional shear flow. *Nature*, *540*(7634), 579-582. https://doi.org/10.1038/nature20602

Wang, L., & Wang, R. (2015). Effect of rapamycin (RAPA) on the growth of lung cancer and its mechanism in mice with A549. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(8), 9208-9213.

Wang, L.-N., Zhang, Z.-T., Wang, L., Wei, H.-X., Zhang, T., Zhang, L.-M., Lin, H., Zhang, H., & Wang, S.-Q. (2022). TGF-β1/SH2B3 axis regulates anoikis resistance and EMT of lung cancer cells by modulating JAK2/STAT3 and SHP2/Grb2 signaling pathways. *Cell Death & Disease*, *13*(5), 472. https://doi.org/10.1038/s41419-022-04890-x

Wang, R., Godet, I., Yang, Y., Salman, S., Lu, H., Lyu, Y., Zuo, Q., Wang, Y., Zhu, Y., Chen, C., He, J., Gilkes, D. M., & Semenza, G. L. (2021). Hypoxia-inducible factor-dependent ADAM12 expression mediates breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(19), e2020490118. https://doi.org/10.1073/pnas.2020490118

Wang, T., Gilkes, D. M., Takano, N., Xiang, L., Luo, W., Bishop, C. J., Chaturvedi, P., Green, J. J., & Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(31), E3234-E3242. https://doi.org/10.1073/pnas.1410041111

Wang, T., Ming, Z., Xiaochun, W., & Hong, W. (2011). Rab7 : Role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic. *Cellular Signalling*, *23*(3), 516-521. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.09.012

Wang, T., Niki, T., Goto, A., Ota, S., Morikawa, T., Nakamura, Y., Ohara, E., Ishikawa, S., Aburatani, H., Nakajima, J., & Fukayama, M. (2007). Hypoxia increases the motility of lung adenocarcinoma

cell line A549 via activation of the epidermal growth factor receptor pathway. *Cancer Science*, *98*(4), 506-511. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00428.x

Wang, W., Xiao, Z.-D., Li, X., Aziz, K. E., Gan, B., Johnson, R. L., & Chen, J. (2015). AMPK modulates Hippo pathway activity to regulate energy homeostasis. *Nature cell biology*, *17*(4), 490-499. https://doi.org/10.1038/ncb3113

Wang, X., Du, Z., Li, L., Shi, M., & Yu, Y. (2015). Beclin 1 and p62 expression in non-small cell lung cancer : Relation with malignant behaviors and clinical outcome. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(9), 10644-10652.

Wang, X., Valls, A. F., Schermann, G., Shen, Y., Moya, I. M., Castro, L., Urban, S., Solecki, G. M., Winkler, F., Riedemann, L., Jain, R. K., Mazzone, M., Schmidt, T., Fischer, T., Halder, G., & Almodóvar, C. R. de. (2017). YAP/TAZ Orchestrate VEGFA Signaling during Developmental Angiogenesis. *Developmental Cell*, *42*(5), 462-478.e7. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.002

Wang, X., Yu, X., Wei, W., & Liu, Y. (2020). Long noncoding RNA MACC1-AS1 promotes the stemness of nonsmall cell lung cancer cells through promoting UPF1-mediated destabilization of LATS1/2. *Environmental Toxicology*, *35*(9), 998-1006. https://doi.org/10.1002/tox.22936

Wang, Y., Jia, J., Wang, F., Fang, Y., Yang, Y., Zhou, Q., Yuan, W., Gu, X., Hu, J., & Yang, S. (2024). Pre-metastatic niche : Formation, characteristics and therapeutic implication. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*, 236. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01937-7

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, *123*(3191), 309-314. https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309

Warren, J. S. A., Xiao, Y., & Lamar, J. M. (2018). YAP/TAZ Activation as a Target for Treating Metastatic Cancer. *Cancers*, *10*(4), 115. https://doi.org/10.3390/cancers10040115

Watanabe, Y., Taguchi, K., & Tanaka, M. (2023). Roles of Stress Response in Autophagy Processes and Aging-Related Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(18), 13804. https://doi.org/10.3390/ijms241813804

Webb, A. H., Gao, B. T., Goldsmith, Z. K., Irvine, A. S., Saleh, N., Lee, R. P., Lendermon, J. B., Bheemreddy, R., Zhang, Q., Brennan, R. C., Johnson, D., Steinle, J. J., Wilson, M. W., & Morales-Tirado, V. M. (2017). Inhibition of MMP-2 and MMP-9 decreases cellular migration, and angiogenesis in in vitro models of retinoblastoma. *BMC Cancer*, *17*(1), 434. https://doi.org/10.1186/s12885-017-3418-y

Wei, F.-Z., Cao, Z., Wang, X., Wang, H., Cai, M.-Y., Li, T., Hattori, N., Wang, D., Du, Y., Song, B., Cao, L.-L., Shen, C., Wang, L., Wang, H., Yang, Y., Xie, D., Wang, F., Ushijima, T., Zhao, Y., & Zhu, W.-G. (2016). Epigenetic regulation of autophagy by the methyltransferase EZH2 through an MTOR-dependent pathway. *Autophagy*, *11*(12), 2309-2322. https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1117734

Wei, H., Wei, S., Gan, B., Peng, X., Zou, W., & Guan, J.-L. (2011). Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. *Genes & Development*, *25*(14), 1510-1527. https://doi.org/10.1101/gad.2051011

Wei, H., Xu, Z., Liu, F., Wang, F., Wang, X., Sun, X., & Li, J. (2017). Hypoxia induces oncogene yes-associated protein 1 nuclear translocation to promote pancreatic ductal adenocarcinoma invasion via epithelial–mesenchymal transition. *Tumor Biology*, *39*(5), 1010428317691684. https://doi.org/10.1177/1010428317691684

Wei, J., Wu, J., Xu, W., Nie, H., Zhou, R., Wang, R., Liu, Y., Tang, G., & Wu, J. (2018). Salvianolic acid B inhibits glycolysis in oral squamous cell carcinoma via targeting PI3K/AKT/HIF-1α signaling pathway. *Cell Death & Disease*, *9*(6), 599. https://doi.org/10.1038/s41419-018-0623-9

Wei, Y., Wang, D., Jin, F., Bian, Z., Li, L., Liang, H., Li, M., Shi, L., Pan, C., Zhu, D., Chen, X., Hu, G., Liu, Y., Zhang, C.-Y., & Zen, K. (2017). Pyruvate kinase type M2 promotes tumour cell exosome release via phosphorylating synaptosome-associated protein 23. *Nature Communications*, *8*, 14041. https://doi.org/10.1038/ncomms14041

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer*, *12*(6), 401-410. https://doi.org/10.1038/nrc3262

White, S. M., Murakami, S., & Yi, C. (2019). The Complex Entanglement of Hippo-Yap/Taz Signaling in Tumor Immunity. *Oncogene*, *38*(16), 2899-2909. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0649-6

Whitehurst, A. W., Ram, R., Shivakumar, L., Gao, B., Minna, J. D., & White, M. A. (2008). The RASSF1A Tumor Suppressor Restrains Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Activity during the G1/S Phase Transition To Promote Cell Cycle Progression in Human Epithelial Cells. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(10), 3190-3197. https://doi.org/10.1128/MCB.02291-07

Wilkinson, D. S., Jariwala, J. S., Anderson, E., Mitra, K., Meisenhelder, J., Chang, J. T., Ideker, T., Hunter, T., Nizet, V., Dillin, A., & Hansen, M. (2015). Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy. *Molecular cell*, *57*(1), 55-68. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.11.019

Williams, C. B., Yeh, E. S., & Soloff, A. C. (2016). Tumor-associated macrophages : Unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *NPJ Breast Cancer*, *2*, 15025. https://doi.org/10.1038/npjbcancer.2015.25

Winkler, F. (2017). Hostile takeover : How tumours hijack pre-existing vascular environments to thrive. *The Journal of Pathology*, *242*(3), 267-272. https://doi.org/10.1002/path.4904

Wirth, M., Joachim, J., & Tooze, S. A. (2013). Autophagosome formation—The role of ULK1 and Beclin1–PI3KC3 complexes in setting the stage. *Seminars in Cancer Biology*, *23*(5), 301-309. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.05.007

Wu, B., Zhang, B., Li, B., Wu, H., & Jiang, M. (2024). Cold and hot tumors : From molecular mechanisms to targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *9*(1), 274. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01979-x

Wu, H., Wei, L., Fan, F., Ji, S., Zhang, S., Geng, J., Hong, L., Fan, X., Chen, Q., Tian, J., Jiang, M., Sun, X., Jin, C., Yin, Z.-Y., Liu, Q., Zhang, J., Qin, F., Lin, K.-H., Yu, J.-S., … Zhou, D. (2015). Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis. *Nature Communications*, *6*(1), 6239. https://doi.org/10.1038/ncomms7239

Wu, H.-M., Jiang, Z.-F., Ding, P.-S., Shao, L.-J., & Liu, R.-Y. (2015). Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Scientific Reports*, *5*, 12291. https://doi.org/10.1038/srep12291

Wu, M.-Z., Tsai, Y.-P., Yang, M.-H., Huang, C.-H., Chang, S.-Y., Chang, C.-C., Teng, S.-C., & Wu, K.-J. (2011). Interplay between HDAC3 and WDR5 is essential for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition. *Molecular Cell*, *43*(5), 811-822. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.012

Wu, Z., Sawada, T., Shiba, K., Liu, S., Kanao, T., Takahashi, R., Hattori, N., Imai, Y., & Lu, B. (2013). Tricornered/NDR kinase signaling mediates PINK1-directed mitochondrial quality control and tissue maintenance. *Genes & Development*, *27*(2), 157-162. https://doi.org/10.1101/gad.203406.112

Xiang, L., Gilkes, D. M., Hu, H., Luo, W., Bullen, J. W., Liang, H., & Semenza, G. L. (2015). HIF-1α and TAZ serve as reciprocal co-activators in human breast cancer cells. *Oncotarget*, *6*(14), 11768-11778. https://doi.org/10.18632/oncotarget.4190

Xiang, L., Gilkes, D. M., Hu, H., Takano, N., Luo, W., Lu, H., Bullen, J. W., Samanta, D., Liang, H., & Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor 1 mediates TAZ expression and nuclear localization to induce the breast cancer stem cell phenotype. *Oncotarget*, *5*(24), 12509-12527. https://doi.org/10.18632/oncotarget.2997

Xiang, Y.-C., Shen, J., Si, Y., Liu, X.-W., Zhang, L., Wen, J., Zhang, T., Yu, Q.-Q., Lu, J.-F., Xiang, K., & Liu, Y. (2021). Paris saponin VII, a direct activator of AMPK, induces autophagy and exhibits therapeutic potential in non-small-cell lung cancer. *Chinese Journal of Natural Medicines*, *19*(3), 195-204. https://doi.org/10.1016/S1875-5364(21)60021-3

Xiao, L., Shi, X.-Y., Zhang, Y., Zhu, Y., Zhu, L., Tian, W., Zhu, B.-K., & Wei, Z.-L. (2016). YAP induces cisplatin resistance through activation of autophagy in human ovarian carcinoma cells. *OncoTargets and therapy*, *9*, 1105-1114. https://doi.org/10.2147/OTT.S102837

Xie, Z., Hur, S. K., Zhao, L., Abrams, C. S., & Bankaitis, V. A. (2018). A Golgi Lipid Signaling Pathway Controls Apical Golgi Distribution and Cell Polarity during Neurogenesis. *Developmental Cell*, *44*(6), 725-740.e4. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.02.025

Xing, F., Liu, Y., Sharma, S., Wu, K., Chan, M. D., Lo, H.-W., Carpenter, R. L., Metheny-Barlow, L. J., Zhou, X., Qasem, S. A., Pasche, B., & Watabe, K. (2016). Activation of the c-Met pathway mobilizes an inflammatory network in the brain microenvironment to promote brain metastasis of breast cancer. *Cancer research*, *76*(17), 4970-4980. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-3541

Xu, H., Wang, J., Al-Nusaif, M., Ma, H., & Le, W. (2023). CCL2 promotes metastasis and epithelial–mesenchymal transition of non-small cell lung cancer via PI3K/Akt/mTOR and autophagy pathways. *Cell Proliferation*, *57*(3), e13560. https://doi.org/10.1111/cpr.13560

Xu, W., Zhang, M., Li, Y., Wang, Y., Wang, K., Chen, Q., Zhang, R., Song, W., Huang, Q., Zhao, W., & Wu, J. (2021). YAP manipulates proliferation via PTEN/AKT/mTOR-mediated autophagy in lung adenocarcinomas. *Cancer Cell International*, *21*, 30. https://doi.org/10.1186/s12935-020-01688-9

Yamamoto, K., Venida, A., Yano, J., Biancur, D. E., Kakiuchi, M., Gupta, S., Sohn, A. S. W., Mukhopadhyay, S., Lin, E. Y., Parker, S. J., Banh, R. S., Paulo, J. A., Wen, K. W., Debnath, J., Kim, G. E., Mancias, J. D., Fearon, D. T., Perera, R. M., & Kimmelman, A. C. (2020). Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature*, *581*(7806), 100-105. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2229-5

Yan, Y., Song, Q., Yao, L., Zhao, L., & Cai, H. (2022). YAP Overexpression in Breast Cancer Cells Promotes Angiogenesis through Activating YAP Signaling in Vascular Endothelial Cells. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*, *2022*, 5942379. https://doi.org/10.1155/2022/5942379

Yang, A., Herter-Sprie, G., Zhang, H., Lin, E. Y., Biancur, D., Wang, X., Deng, J., Hai, J., Yang, S., Wong, K.-K., & Kimmelman, A. C. (2018). Autophagy Sustains Pancreatic Cancer Growth through Both Cell-Autonomous and Nonautonomous Mechanisms. *Cancer Discovery*, *8*(3), 276-287. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-17-0952

Yang, H., Yang, J., Zheng, X., Chen, T., Zhang, R., Chen, R., Cao, T., Zeng, F., & Liu, Q. (2024). The Hippo Pathway in Breast Cancer : The Extracellular Matrix and Hypoxia. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(23), Article 23. https://doi.org/10.3390/ijms252312868

Yang, M.-H., Wu, M.-Z., Chiou, S.-H., Chen, P.-M., Chang, S.-Y., Liu, C.-J., Teng, S.-C., & Wu, K.-J. (2008). Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis. *Nature Cell Biology*, *10*(3), 295-305. https://doi.org/10.1038/ncb1691

Yang, Q., Wang, R., & Zhu, L. (2019). Chaperone-Mediated Autophagy. In Z.-H. Qin (Éd.), *Autophagy : Biology and Diseases : Basic Science* (p. 435-452). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0602-4_20

Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell'Antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N., & Kimmelman, A. C. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & Development*, *25*(7), 717-729. https://doi.org/10.1101/gad.2016111

Yang, X., Zhang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qiu, L., Zhuang, Z., Wei, M., Deng, X., Wang, Z., & Han, J. (2021). The Key Role of Exosomes on the Pre-metastatic Niche Formation in Tumors. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *8*, 703640. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.703640

Yang, Y., & Cao, Y. (2022). The impact of VEGFA on cancer metastasis and systemic disease. *Seminars in Cancer Biology*, *86*, 251-261. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.03.011

Yang, Y., Zheng, H., Zhan, Y., & Fan, S. (2019). An emerging tumor invasion mechanism about the collective cell migration. *American Journal of Translational Research*, *11*(9), 5301-5312.

Yang, Y., Zhu, Y., Zhou, S., Tang, P., Xu, R., Zhang, Y., Wei, D., Wen, J., Thorne, R. F., Zhang, X. D., Guan, J.-L., Liu, L., Wu, M., & Chen, S. (2022). TRIM27 cooperates with STK38L to inhibit ULK1-mediated autophagy and promote tumorigenesis. *The EMBO Journal*, *41*(14), e109777. https://doi.org/10.15252/embj.2021109777

Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Mammalian autophagy : Core molecular machinery and signaling regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, *22*(2), 124-131. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.11.014

Yao, R., & Shen, J. (2023). Chaperone-mediated autophagy : Molecular mechanisms, biological functions, and diseases. *MedComm*, *4*(5), e347. https://doi.org/10.1002/mco2.347

Ye, X., Xie, G., Liu, Z., Tang, J., Cui, M., Wang, C., Guo, C., & Tang, J. (2020). TNNC1 Reduced Gemcitabine Sensitivity of Nonsmall-Cell Lung Cancer by Increasing Autophagy. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *26*, e922703-1-e922703-12. https://doi.org/10.12659/MSM.922703

Ye, Y., Hu, Q., Chen, H., Liang, K., Yuan, Y., Xiang, Y., Ruan, H., Zhang, Z., Song, A., Zhang, H., Liu, L., Diao, L., Lou, Y., Zhou, B., Wang, L., Zhou, S., Gao, J., Jonasch, E., Lin, S. H., … Han, L. (2019). Characterization of Hypoxia-associated Molecular Features to Aid Hypoxia-Targeted Therapy. *Nature metabolism*, *1*(4), 431-444. https://doi.org/10.1038/s42255-019-0045-8

Yeo, S. K., Wen, J., Chen, S., & Guan, J.-L. (2016). Autophagy Differentially Regulates Distinct Breast Cancer Stem-like Cells in Murine Models via EGFR/Stat3 and Tgfβ/Smad Signaling. *Cancer Research*, *76*(11), 3397-3410. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2946

Yin, F., Yu, J., Zheng, Y., Chen, Q., Zhang, N., & Pan, D. (2013). Spatial Organization of Hippo Signaling at the Plasma Membrane Mediated by the Tumor Suppressor Merlin/NF2. *Cell*, *154*(6), 1342-1355. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.025

Yin, H.-L., Xu, H.-W., & Lin, Q.-Y. (2020). miR129-1 regulates protein phosphatase 1D protein expression under hypoxic conditions in non-small cell lung cancer cells harboring a TP53 mutation. *Oncology Letters*, *20*(3), 2239-2247. https://doi.org/10.3892/ol.2020.11783

Young, A. R. J., Chan, E. Y. W., Hu, X. W., Köchl, R., Crawshaw, S. G., High, S., Hailey, D. W., Lippincott-Schwartz, J., & Tooze, S. A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *Journal of Cell Science*, *119*(18), 3888-3900. https://doi.org/10.1242/jcs.03172

Young, A. R. J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J. F. J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F. M., & Narita, M. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development*, *23*(7), 798-803. https://doi.org/10.1101/gad.519709

Young, S. D., Marshall, R. S., & Hill, R. P. (1988). Hypoxia induces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(24), 9533-9537. https://doi.org/10.1073/pnas.85.24.9533

Yu, B., Miao, Z.-H., Jiang, Y., Li, M.-H., Yang, N., Li, T., & Ding, J. (2009). C-Jun protects hypoxia-inducible factor-1alpha from degradation via its oxygen-dependent degradation domain in a nontranscriptional manner. *Cancer Research*, *69*(19), 7704-7712. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0808

Yu, F.-X., Zhang, Y., Park, H. W., Jewell, J. L., Chen, Q., Deng, Y., Pan, D., Taylor, S. S., Lai, Z.-C., & Guan, K.-L. (2013). Protein kinase A activates the Hippo pathway to modulate cell proliferation and differentiation. *Genes & Development*, *27*(11), 1223-1232. https://doi.org/10.1101/gad.219402.113

Yu, F.-X., Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J. L., Lian, I., Wang, L. H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X.-D., Mills, G. B., & Guan, K.-L. (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein coupled receptor signaling. *Cell*, *150*(4), 780-791. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.037

Yu, L., McPhee, C. K., Zheng, L., Mardones, G. A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D. W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E. H., & Lenardo, M. J. (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*, *465*(7300), 942-946. https://doi.org/10.1038/nature09076

Yuan, P., Hu, Q., He, X., Long, Y., Song, X., Wu, F., He, Y., & Zhou, X. (2020). Laminar flow inhibits the Hippo/YAP pathway via autophagy and SIRT1-mediated deacetylation against atherosclerosis. *Cell Death & Disease*, *11*(2), 141. https://doi.org/10.1038/s41419-020-2343-1

Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., & Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(25), 15077-15082. https://doi.org/10.1073/pnas.2436255100

Zanconato, F., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2019). YAP and TAZ : A signalling hub of the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, *19*(8), 454-464. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0168-y

Zeng, S.-G., Lin, X., Liu, J.-C., & Zhou, J. (2019). Hypoxia-induced internalization of connexin 26 and connexin 43 in pulmonary epithelial cells is involved in the occurrence of non-small cell lung cancer via the P53/MDM2 signaling pathway. *International Journal of Oncology*, *55*(4), 845-859. https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4867

Zeng, W., Xiao, T., Cai, A., Cai, W., Liu, H., Liu, J., Li, J., Tan, M., Xie, L., Liu, Y., Yang, X., & Long, Y. (2017). Inhibiting ROS-TFEB-Dependent Autophagy Enhances Salidroside-Induced Apoptosis in Human Chondrosarcoma Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *43*(4), 1487-1502. https://doi.org/10.1159/000481971

Zhan, P., Wang, J., Lv, X., Wang, Q., Qiu, L., Lin, X., Yu, L., & Song, Y. (2009). Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Patients with Lung Cancer : A Systematic Review with Meta-Analysis. *Journal of Thoracic Oncology*, *4*(9), 1094-1103. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181a97e31

Zhan, Z., Xie, X., Cao, H., Zhou, X., Zhang, X. D., Fan, H., & Liu, Z. (2014). Autophagy facilitates TLR4- and TLR3-triggered migration and invasion of lung cancer cells through the promotion of TRAF6 ubiquitination. *Autophagy*, *10*(2), 257-268. https://doi.org/10.4161/auto.27162

Zhang, C., Zhou, L., Zhang, M., Du, Y., Li, C., Ren, H., & Zheng, L. (2024). H3K18 Lactylation Potentiates Immune Escape of Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, *84*(21), 3589-3601. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-23-3513

Zhang, F., Huang, B., Xu, Y., Cao, G., Shen, M., Liu, C., & Luo, J. (2025). MISP Suppresses Ferroptosis via MST1/2 Kinases to Facilitate YAP Activation in Non-Small Cell Lung Cancer. *Advanced Science*, *12*(16), 2415814. https://doi.org/10.1002/advs.202415814

Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K. I., Dang, C. V., & Semenza, G. L. (2007). HIF-1 Inhibits Mitochondrial Biogenesis and Cellular Respiration in VHL-Deficient Renal Cell Carcinoma by Repression of C-MYC Activity. *Cancer Cell*, *11*(5), 407-420. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.04.001

Zhang, H., Koch, C. J., Wallen, C. A., & Wheeler, K. T. (1995). Radiation-induced DNA damage in tumors and normal tissues. III. Oxygen dependence of the formation of strand breaks and DNA-protein crosslinks. *Radiation Research*, *142*(2), 163-168.

Zhang, W., Shi, X., Peng, Y., Wu, M., Zhang, P., Xie, R., Wu, Y., Yan, Q., Liu, S., & Wang, J. (2015). HIF-1α Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer. *PloS One*, *10*(6), e0129603. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129603

Zhang, X., Abdelrahman, A., Vollmar, B., & Zechner, D. (2018). The Ambivalent Function of YAP in Apoptosis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(12), 3770. https://doi.org/10.3390/ijms19123770

Zhang, X., Li, Y., Ma, Y., Yang, L., Wang, T., Meng, X., Zong, Z., Sun, X., Hua, X., & Li, H. (2018). Yes-associated protein (YAP) binds to HIF-1α and sustains HIF-1α protein stability to promote hepatocellular carcinoma cell glycolysis under hypoxic stress. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR*, *37*, 216. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0892-2

Zhang, Y., Yan, S., Li, Y., Zhang, J., Luo, Y., Li, P., Yang, Y., Li, Y., Huang, Y., & Wang, E. (2021). Inhibin βA is an independent prognostic factor that promotes invasion via Hippo signaling in non-small cell lung cancer. *Molecular Medicine Reports*, *24*(5), 789. https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12429

Zhang, Z., Chen, C., Yang, F., Zeng, Y.-X., Sun, P., Liu, P., & Li, X. (2022). Itaconate is a lysosomal inducer that promotes antibacterial innate immunity. *Molecular Cell*, *82*(15), 2844-2857.e10. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.009

Zhao, B., Dierichs, L., Gu, J.-N., Trajkovic-Arsic, M., Axel Hilger, R., Savvatakis, K., Vega-Rubin-de-Celis, S., Liffers, S.-T., Peña-Llopis, S., Behrens, D., Hahn, S., Siveke, J. T., & Lueong, S. S. (2020). TFEB-mediated lysosomal biogenesis and lysosomal drug sequestration confer resistance to MEK inhibition in pancreatic cancer. *Cell Death Discovery*, *6*, 12. https://doi.org/10.1038/s41420-020-0246-7

Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.-Y., Yu, J., & Guan, K.-L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes & Development*, *26*(1), 54-68. https://doi.org/10.1101/gad.173435.111

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R. S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.-C., & Guan, K.-L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by

the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, *21*(21), 2747-2761. https://doi.org/10.1101/gad.1602907

Zhao, D., Zhai, B., He, C., Tan, G., Jiang, X., Pan, S., Dong, X., Wei, Z., Ma, L., Qiao, H., Jiang, H., & Sun, X. (2014). Upregulation of HIF-2α induced by sorafenib contributes to the resistance by activating the TGF-α/EGFR pathway in hepatocellular carcinoma cells. *Cellular Signalling*, *26*(5), 1030-1039. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.01.026

Zhao, J., Qiao, C.-R., Ding, Z., Sheng, Y.-L., Li, X.-N., Yang, Y., Zhu, D.-Y., Zhang, C.-Y., Liu, D.-L., Wu, K., & Zhao, S. (2017). A novel pathway in NSCLC cells : miR-191, targeting NFIA, is induced by chronic hypoxia, and promotes cell proliferation and migration. *Molecular Medicine Reports*, *15*(3), 1319-1325. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6100

Zhao, M., Zhang, Y., Jiang, Y., Wang, K., Wang, X., Zhou, D., Wang, Y., Yu, R., & Zhou, X. (2021). YAP promotes autophagy and progression of gliomas via upregulating HMGB1. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, *40*(1), 99. https://doi.org/10.1186/s13046-021-01897-8

Zhao, Q., Li, Y., Tan, B., Fan, L., Yang, P., & Tian, Y. (2015). HIF-1α Induces Multidrug Resistance in Gastric Cancer Cells by Inducing MiR-27a. *PLoS ONE*, *10*(8), e0132746. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132746

Zhao, X., Gao, S., Ren, H., Sun, W., Zhang, H., Sun, J., Yang, S., & Hao, J. (2014). Hypoxia-inducible factor-1 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis by activating transcription of the actin-bundling protein fascin. *Cancer Research*, *74*(9), 2455-2464. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3009

Zhao, Y., Sheldon, M., Sun, Y., & Ma, L. (2023). New Insights into YAP/TAZ-TEAD-Mediated Gene Regulation and Biological Processes in Cancer. *Cancers*, *15*(23), 5497. https://doi.org/10.3390/cancers15235497

Zhao, Z., Li, J., Jiang, Y., Xu, W., Li, X., & Jing, W. (2017). CLDN1 Increases Drug Resistance of Non-Small Cell Lung Cancer by Activating Autophagy via Up-Regulation of ULK1 Phosphorylation. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, *23*, 2906-2916. https://doi.org/10.12659/MSM.904177

Zheng, L., Zhou, H., Guo, L., Xu, X., Zhang, S., Xu, W., & Mao, W. (2018). Inhibition of NIPBL enhances the chemosensitivity of non-small-cell lung cancer cells via the DNA damage response and autophagy pathway. *OncoTargets and therapy*, *11*, 1941-1948. https://doi.org/10.2147/OTT.S158655

Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W., & Semenza, G. L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells : Implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Research*, *60*(6), 1541-1545.

Zhou, C., Ma, K., Gao, R., Mu, C., Chen, L., Liu, Q., Luo, Q., Feng, D., Zhu, Y., & Chen, Q. (2017). Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. *Cell Research*, *27*(2), 184-201. https://doi.org/10.1038/cr.2016.146

Zhou, F., Wu, Z., Zhao, M., Murtazina, R., Cai, J., Zhang, A., Li, R., Sun, D., Li, W., Zhao, L., Li, Q., Zhu, J., Cong, X., Zhou, Y., Xie, Z., Gyurkovska, V., Li, L., Huang, X., Xue, Y., … Segev, N. (2019). Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *The Journal of Cell Biology*, *218*(6), 1908-1927. https://doi.org/10.1083/jcb.201811173

Zhou, X., Wang, S., Wang, Z., Feng, X., Liu, P., Lv, X.-B., Li, F., Yu, F.-X., Sun, Y., Yuan, H., Zhu, H., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., & Guan, K.-L. (2015). Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(5), 2123-2135. https://doi.org/10.1172/JCI79573

Zhou, Y., Wang, Y., Zhou, W., Chen, T., Wu, Q., Chutturghoon, V. K., Lin, B., Geng, L., Yang, Z., Zhou, L., & Zheng, S. (2019). YAP promotes multi-drug resistance and inhibits autophagy-related cell death in hepatocellular carcinoma via the RAC1-ROS-mTOR pathway. *Cancer Cell International*, *19*, 179. https://doi.org/10.1186/s12935-019-0898-7

Zhu, H., & Zhang, S. (2018). Hypoxia inducible factor-1α/vascular endothelial growth factor signaling activation correlates with response to radiotherapy and its inhibition reduces hypoxia-induced angiogenesis in lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(9), 7707-7718. https://doi.org/10.1002/jcb.27120

Zoppino, F. C. M., Militello, R. D., Slavin, I., Alvarez, C., & Colombo, M. I. (2010). Autophagosome formation depends on the small GTPase Rab1 and functional ER exit sites. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *11*(9), 1246-1261. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01086.x

# *Curriculum Vitae – Tiphaine BIOJOUT*

e-mail: Job: biojout@cyceron.fr
Personal: tiphaine.biojout9@gmail.com
Telephone: +33 605161387

Date of birth: 05/02/1999

**Mother tongue: French**
**Other tongue: English - professional**

## *Work Experience*

**09/2022-09/2025 | PhD in Life & Health Sciences**
University of Caen Normandy
UMR 6030 – CNRS – ISTCT: Imaging and therapeutic strategies for cancers and cerebral
PI: Dr. Jérôme Levallet PhD and Prof. Guénaëlle Levallet
Project: *Brain metastases of bronchial origin: role of the NDR2 kinase interactome*

**January - June 2022 | Research internship**
UMR 6030 – CNRS – ISTCT: Imaging and therapeutic strategies for cancers and cerebral
Tutors: Prof. Guénaëlle Levallet, Dr. Jérôme Levallet PhD
Subject: *Characterization and role of the NDR2 kinase interactome in bronchial tumor cells*

**April – May 2021 | Research internship**
UMR 6030 – CNRS – ISTCT: Imaging and therapeutic strategies for cancers and cerebral
Tutors: Prof. Guénaëlle Levallet, Dr. Jérôme Levallet PhD
Subject: *Regulation of ARNT by NDR kinases and consequences on adaptation of bronchial tumor cells to a hypoxic environment*

## *Education*

**09/2022-09/2025 | PhD in Life & Health Sciences**
University of Caen Normandy

**2020 – 2022 | MASTER of Science in Biology-Health – Cancer, Differentiation, Genetics and Biotherapies**
UFR des Sciences - University of Caen Normandy - 14000 Caen - FRANCE

**2017 – 2020 | Bachelor of Science in Health sciences – Biotechnology for health**
UFR des Sciences - La Rochelle University - 17000 La Rochelle – France
Tutored project: *Study of the therapeutic and coloring coloring potential of brazilin*

May 2020 - Scientific watch internship in collaboration with ARRDHOR-CRITT Horticole
22 Rue de l'Arsenal - 17300 Rochefort – France
Subject: *Dyeing properties of Carthamus tinctorius L.*

**2017 |Scientific High School Diploma (Physics and Chemistry Specialty)**
1700 Saintes – France

## *Supervision*

**06/2024 – 08/2024| Master internship supervisor**
Subject: *Roles of NDR kinases in the regulation of autophagy in NSCLC cells*

**02/12/2024 – 06/12/2024 | Bachelor of Science internship supervisor**

## *Scientific mediation*

General public:
Stand at the "Fête de la science" October 2022, 2023, 2024, CAEN
Stand at the "Festival de l'excellence Normande" October 2022 CAEN

School:
Meeting with high school students, "Atelier des Chercheur-se-s"
Meeting with elementary school pupils during "la semaine du cerveau" March 2023

## *Technical and lab skills*

***Cell Biology***
Human Cell cultures, Hypoxia culture, Immunofluorescence, Immunohistochemistry, Cell transfection, Cell migration assay (Transwells and Ibidi), Mammalian cell protein expression, Viability/cytotoxicity assay, Protein-protein interaction: CoImmunoprecipitation,

***Molecular Biology***
Protein extraction/purification, SDS-PAGE, Western Blot, RNA extraction/purification, Primers design, RT-qPCR, RNA interference (siRNAs)

***Imaging***
Confocal microscopy, Time laps microscopy, Conventional microscopy

***Informatic***
ImageJ, Fiji, QPath, BLAST, Primer-Blast, Primer Bank, GraphPad Prism, Microsoft Office (Word, Excel and PowerPoint)

***Other***
Consumables management for the lab (medium, plastic consumables …), member of the unit council

# *Oral communications and Posters*

**Oral Communications**

• Tiphaine Biojout, Fatéméh Dubois, Emmanuel Bergot, Jérôme Levallet, Guénaëlle Levallet: ***Roles of MST3 kinase in the acquisition of pro-metastatic properties induced by NDR2 hyperactivation in NSCLC cells.*** Flash Talk, Journée de l'Ecole doctorale NBise, 2023, Rouen

• Tiphaine Biojout, Jérôme Levallet, Céline Bazille, Manon Douyère, Fatéméh Dubois, Dimitri Leite Ferreira, Jasmine Taylor, Sylvain Teulier, Jérôme Toutain, Nicolas Elie, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Emmanuel Bergot, Guénaëlle Levallet: ***Hypoxia-induced NDR2 activation contributes to brain metastasis of non-small cell lung cancer.*** Journées scientifiques du CANCEROPOLE NORD-OUEST, May 15-16-17, 2024, Deauville

**Posters**

• Tiphaine Biojout, Dimitri Leite Ferreira, Fatéméh Dubois, Emmanuel Bergot, Jérôme Levallet, Guénaëlle Levallet: ***Roles of MST3 kinase in the acquisition of pro-metastatic properties induced by NDR2 hyperactivation in Non-Small Cell Bronchial Cancer cells*.** Journées scientifiques du CANCEROPOLE NORD-OUEST, May 10-11-12, 2023, Deauville

• Tiphaine Biojout, Nicolas Elie, Benoit Bernay, Emmanuel Bergot, Jérôme Levallet, Guénaëlle Levallet: ***Hyperactivation of the NDR2 kinase induces metastasis in NSCLC patients by altering the structure and functions of the Golgi apparatus***. Journées scientifiques du CANCEROPOLE NORD-OUEST, May 15-16-17, 2024, Deauville

• Tiphaine Biojout, Jérôme Levallet, Céline Bazille, Fatéméh Dubois, Dimitri Leite Ferreira, Jasmine Taylor, Jérôme Toutain, Nicolas Elie, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Emmanuel Bergot, Guénaëlle Levallet: ***NDR2 kinase promotes brain metastases in NSCLC patients.*** 22nd International AEK Cancer Congress, March 5-6-7, 2025, Berlin

• Tiphaine Biojout, Emmanuel Bergot, Laurent Chatre, Benoit Bernay, Guénaëlle Levallet, Jérôme Levallet: ***Dissecting the functions of the Hippo kinase NDR2: from its physiological role to its involvement in carcinogenesis***. Journées scientifiques du CANCEROPOLE NORD-OUEST, May 14-15-16, 2025, Deauville

• Tiphaine Biojout, Nicolas Elie, Emmanuel Bergot, Jérôme Levallet, Guénaëlle Levallet: ***NDR2 kinase promotes migration of serum-starved non-small-cell lung cancer cells by initiating autophagy.*** Journées scientifiques du CANCEROPOLE NORD-OUEST, May 14-15-16, 2025, Deauville

# *Publications*

Jérôme Levallet, Tiphaine Biojout, Céline Bazille, Manon Douyère, Fatéméh Dubois, Dimitri Leite Ferreira, Jasmine Taylor, Sylvain Teulier, Jérôme Toutain, Nicolas Elie, Myriam Bernaudin, Samuel Valable, Emmanuel Bergot, Guénaëlle Levallet

***Hypoxia-induced activation of NDR2 underlies brain metastases from Non-Small Cell Lung Cancer.***
Cell Death & Disease, 2023, doi: 10.1038/s41419-023-06345-3

Tiphaine Biojout, Emmanuel Bergot, Benoit Bernay, Guénaëlle Levallet, Jérôme Levallet
*NDR2 kinase: A review of its physiological role and involvement in carcinogenesis.*
International Journal of Biological Macromolecules, 2025, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.143656

Dimitri Leite Ferreira*, Tiphaine Biojout*, Céline Bazille, Lucie Malandain, Maelle Guyot, Jeannick Madelaine, Jérôme Levallet, Emmanuel Bergot, Guénaëlle Levallet
***Amphiregulin reflects brain metastasis progression and leads to PD-L1 expression in non-small cell lung cancer cells.***
Biomed Pharmacother, 2025, doi: 10.1016/j.biopha.2025.118600

*co-first author

Tiphaine Biojout, Emmanuel Bergot, Jasmine Taylor, Dimitri Leite Ferreira, Marc Riffet, Nicolas Elie, Maelle Guyot, Céline Bazille, Jérôme Levallet, Guénaëlle Levallet
***NDR2 regulates non-small cell lung cancer cell migration under starvation by supporting autophagosome biogenesis through LC3 and ATG9A regulation***
*(***Accepted***)*

## *References*

**Prof. Guénaëlle Levallet (PhD, HDR)**: guenaelle.levallet@unicaen.fr
CNRS, ISTCT UMR6030, GIP CYCERON, Caen, F-14074 France
University of Caen Normandie,
Coordinator of the Caen University Hospital Genomics Platform and SF-MOCAE (Structure Fédérative d'oncongénétique Cyto-Moléculaire du CHU-Caen)
Department of Pathology, CHU de Caen, Caen, F-14000 France

**Dr. Jérôme Levallet (PhD, HDR)**: jerome.levallet@unicaen.fr
CNRS, ISTCT UMR6030, GIP CYCERON, Caen, F-14074 France
University of Caen Normandie

## Métastases cérébrales d'origines bronchique : Rôle de l'interactome de la kinase NDR2


### Résumé

La kinase NDR2 est fréquemment suractivée dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC), contribuant à leur progression agressive. Cette thèse avait pour objectif d'élucider les fonctions oncogéniques de NDR2 et d'identifier ses partenaires moléculaires impliqués dans les processus d'invasion et de métastase. Nos travaux montrent que NDR2 est indispensable à la réponse des cellules tumorales à l'hypoxie, *via* l'activation indirecte de trois facteurs de transcription majeurs : YAP-1, c-Jun et HIF-1α. Cette activation favorise la survie, la migration et l'invasion des cellules de CBNPC. Par ailleurs, nous démontrons que NDR2 est requise pour l'implantation et le développement de métastases cérébrales d'origine bronchique.

La réalisation de l'interactome de NDR2 a ensuite permis d'identifier de nouveaux partenaires, notamment impliqués dans l'autophagie, un processus aux fonctions ambivalentes en cancérogenèse. Nous montrons que NDR2 est nécessaire à la biogenèse des autophagosomes, *via* une régulation transcriptionnelle de LC3 et une interaction directe avec ATG9A. Cette activation de l'autophagie par NDR2 confère un avantage de survie et de migration aux cellules tumorales en condition de privation nutritionnelle.

Ainsi, NDR2 émerge comme un acteur central de l'agressivité des CBNPC, en modulant l'adaptation au microenvironnement tumoral et la dissémination métastatique. Ces résultats positionnent NDR2 à la fois comme biomarqueur potentiel d'agressivité et comme cible thérapeutique prometteuse dans les CBNPC.



***Mots clé*** : Hippo, NDR2, CBNPC, Métastases, Hypoxie, Autophagie


## Brain metastases of bronchial origin: Role of the NDR2 kinase interactome


### Abstract

The kinase NDR2 is frequently overactivated in non-small cell lung cancer (NSCLC), contributing to its aggressive progression. This thesis aimed to elucidate the oncogenic functions of NDR2 and to identify its molecular partners involved in invasion and metastasis. Our work demonstrates that NDR2 is essential for the response of tumor cells to hypoxia through the indirect activation of three major transcription factors: YAP-1, c-Jun, and HIF-1α. This activation promotes survival, migration, and invasion of NSCLC cells. Furthermore, we show that NDR2 is required for the establishment and development of brain metastases originating from bronchial tumors.

Mapping the NDR2 interactome led to the identification of novel partners, notably involved in autophagy, a process with dual roles in cancer. We demonstrate that NDR2 is necessary for autophagosome biogenesis through transcriptional regulation of LC3 and direct interaction with ATG9A. This activation of autophagy by NDR2 provides a survival and migratory advantage to tumor cells under nutrient-deprived conditions.

Thus, NDR2 emerges as a central driver of NSCLC aggressiveness, by modulating adaptation to the tumor microenvironment and metastatic dissemination. These findings position NDR2 as both a potential biomarker of aggressiveness and a promising therapeutic target in NSCLC.



***Keywords***: Hippo, NDR2, NSCLC, Metastases, Hypoxia, Autophagy