



Rôle de l'axe Autotaxine (ATX)- Acide Lysophosphatidique (LPA) et récepteur LPA1 dans la dissémination métastatique des cancers du sein

Marion David

► To cite this version:

Marion David. Rôle de l'axe Autotaxine (ATX)- Acide Lysophosphatidique (LPA) et récepteur LPA1 dans la dissémination métastatique des cancers du sein. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2010. Français. NNT : 2010LYO10314 . tel-00878970

HAL Id: tel-00878970

<https://theses.hal.science/tel-00878970>

Submitted on 31 Oct 2013

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

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

Université Claude Bernard - LYON 1

ECOLE DOCTORALE : Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE

(Arrêté du 7 août 2006)

Par

Marion DAVID

**Rôle de l'axe Autotaxine (ATX)- Acide Lysophosphatidique (LPA) et
récepteur LPA₁ dans la dissémination métastatique des cancers du
sein.**

INSERM U664 :

« Mécanismes et Traitements des Métastases Osseuses des Tumeurs Solides »

Thèse dirigée par le Dr Olivier PEYRUCHAUD

Thèse soutenue le **15 décembre 2010**

Membres du jury :

Monsieur le Professeur Roland CHAPURLAT

Madame le Docteur Françoise RÉDINI

Madame le Docteur Florence CABON

Monsieur le Docteur Olivier PEYRUCHAUD

Monsieur le Docteur Jean-Sébastien SAULNIER-BLACHE

Monsieur le Docteur Philippe CLÉZARDIN

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

Examineur

Directeur de l'Unité 664

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Philippe CLÉZARDIN pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire dès mon premier stage de master et de m'avoir donnée les moyens scientifiques et matériels pour développer ce travail de thèse.

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, le Dr. Olivier PEYRUCHAUD pour l'aide compétente qu'il m'a apportée, pour sa patience et son encouragement. De part sa disponibilité et sa gentillesse, ces 5 années passées en sa compagnie ont été vraiment de très bonnes années aussi bien d'un point de vue professionnel, que personnel. Je n'oublierai jamais le congrès de San Diego...

Je remercie également le Dr. Florence CABON et le Dr Françoise RÉDINI pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu me porter en acceptant d'être rapporteurs et en me faisant bénéficier de leur critiques constructives. Je tiens également à exprimer mes remerciements au Pr. Roland CHAPURLAT pour avoir accepté de présider mon jury et au Dr. Jean-Sébastien SAULNIER-BLACHE qui m'a fait l'honneur d'examiner mon travail.

Je souhaite associer ce travail à tous les membres de l'équipe U664 qui ont été là pour m'aider et me conseiller : Johnny, Claire-Marie, Martine, Ismahène, Delphine, Edith... Un grand merci, à Marie-Claude pour son écoute, les bonnes rigolades et le temps consacré à redonner un peu de rigueur à ma plume qui a tendance quelques fois à dérapier. Enfin, je n'oublie pas ceux qui ont été membres de l'équipe mais qui ne le sont plus. Je pense notamment à Florence, Richard, Claire et à ma poufette préférée Blandine.

Enfin, une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé une salle, un café, un repas ou un délire et qui sont devenus au fil du temps mes amis : Vincent avec qui j'ai partagé toute les étapes stratégiques du « comment devenir un bon docteur », Anaïs présente à la fois dans les coups durs que dans les bons moments, ma star préférée du bureau d'en face, Béné, qui est capable de parler pendant une journée entière non-stop, Lise qui m'a fait découvrir le merveilleux jeu du shabadabada et enfin mon petit stagiaire préféré, Raphaël qui a su me supporter avec sourire.

Je souhaite remercier ma famille pour leur aide et leur soutien : mes parents et mon frère qui ont toujours été présents et sur lesquels je peux toujours compter. Un grand merci tout particulier à ma maman qui a partagé avec moi un peu du monde de la biologie chaque année au moment de mes partiels.

Résumé

Rôle de l'axe Autotaxine (ATX)- Acide Lysophosphatidique (LPA) et récepteur LPA₁ dans la dissémination métastatique des cancers du sein.

Les métastases sont des conséquences dramatiques lors de la progression des cancers. Malgré les traitements actuels la médiane de survie de patients atteints de métastases osseuses n'est que de 24 mois. Donc l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement ou la prévention des métastases revêt un caractère crucial. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier le rôle de l'acide lysophosphatidique (LPA) et de l'autotaxine (ATX) dans la dissémination métastatique des cancers du sein. Notre laboratoire a montré que le LPA contrôle la croissance tumorale et la progression des métastases osseuses dans le contexte des cancers du sein. On sait depuis peu qu'en raison de son activité lysophospholipase D, ATX produit du LPA à partir de la lysophosphatidylcholine et contrôle les niveaux de LPA dans la circulation sanguine. ATX est une protéine sécrétée présentant des propriétés métastatiques. Les travaux présentés dans cette thèse montrent que l'expression d'ATX par les cellules tumorales contrôle les événements précoces de la dissémination métastatique des cancers du sein ainsi que le processus plus tardif de formation et de progression des métastases osseuses en agissant sur la fonction ostéoclastique. Il existe un grand nombre de récepteurs capables de transmettre l'activation cellulaire par le LPA (LPA₁₋₆). Ce travail de thèse montre également que le niveau d'expression du récepteur LPA₁ au niveau de la tumeur primaire est un facteur prédictif de la rechute métastatique chez les patientes ayant un cancer du sein. D'autre part dans un modèle animal préclinique, nous avons observé que le ciblage thérapeutique précoce de LPA₁ par le DEBIO-0719 bloque efficacement la dissémination métastatique des cellules de cancer du sein. En conclusion, nos résultats montrent que le ciblage de l'axe ATX/LPA/LPA₁ présente un haut potentiel thérapeutique chez des patientes atteintes d'un cancer du sein à fort risque métastatique.

Mots-clés : cancer du sein, métastases, autotaxine, LPA, LPA₁

Abstract

Involvement of the Autotaxin (ATX)-Lysophosphatidic acid (LPA)- LPA₁ receptor axe in breast cancer metastatic dissemination.

Metastases consist of poor disease progression for patients with cancers. Bone metastases are frequently found in multiple cancers. Despite the improvement of current therapies, the survival of bone metastasis patients is only 24 months. The aim of this work consisted in understanding the role of lysophosphatidic acid (LPA), autotaxin (ATX) and the LPA receptor LPA₁ in the metastatic dissemination of breast cancers. Our laboratory showed previously that LPA produced tumor growth and the progression of osteolytic bone metastases of breast cancer cells. Due to its lysophospholipase D activity, ATX generates LPA from lysophosphatidylcholine and controls LPA levels in the blood. ATX is a secreted protein with metastatic properties. In the present thesis, we first demonstrated that ATX expressed by tumors cells controls early events of metastatic dissemination of breast cancer cells and latter bone metastases formation and progression by acting on osteoclastic function. There is a large number of receptors mediating the cellular activation of LPA (LPA₁₋₆). This work showed additionally that the LPA₁ expression level at the primary tumor site is predictive for the metastatic relapse of breast cancers. On the other hand, in a preclinical animal model, we observed that targeting LPA₁ at early stage of tumor development with the DEBIO-0719 decreased efficiently the metastatic dissemination of breast cancer cells. Altogether, these results indicate that targeting the ATX/LPA/LPA₁ track has a high therapeutic potential against metastasis formation for patients with breast cancer.

Keywords: breast cancer, metastases, autotaxin, LPA, LPA₁

Sommaire

Résumé.....	1
Abstract	3
Sommaire	4
Table des illustrations.....	8
Liste des tableaux.....	9
Liste des abréviations	10
PARTIE I : AVANT PROPOS	12
PARTIE II : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	15
A. La physiologie osseuse	16
1. Le tissu osseux	16
2. Composition de l'os.....	17
3. Les cellules osseuses.....	18
a.Les ostéoclastes	18
•Ostéoclastogenèse	18
•Organisation cellulaire	20
b.Les ostéoblastes.....	20
• Ostéoblastogenèse.....	21
•La voie Wnt β -caténine	22
c.Les ostéocytes	23
4. Le remodelage osseux	23
5. Régulation du remodelage osseux	25
B. Les métastases osseuses	27
1. Le processus métastatique	28
a.Mécanismes impliqués dans la migration des cellules métastatiques vers l'os	29
•CXCR-4.....	29
•RANKL.....	30

b. Invasion/migration à l'os	30
• Les intégrines	30
• Les protéases.....	31
c. Ostéomimétisme.....	31
2. Les métastases ostéolytiques.....	32
a. Les stimulateurs de la résorption osseuse	34
• La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP).....	34
• Les cytokines	34
• Les prostaglandines.....	35
• Le LPA	35
b. Les inhibiteurs de la résorption osseuse	36
c. La contribution du tissu osseux.....	36
3. Les métastases ostéoblastiques	37
a. Endothéline-1.....	38
b. PSA et PTHrP	39
c. Autres facteurs	39
C. Autotaxine (ATX) et acide lysophosphatidique (LPA)	40
1. L'acide lysophosphatidique.....	40
a. Structure biochimique du LPA	40
b. Production de l'acide lysophosphatidique	41
• Production de LPA par l'autotaxine (ATX).....	41
• Production de LPA par les phospholipases	41
c. Dégradation du LPA.....	43
2. Les récepteurs du LPA.....	43
a. Structure et distribution des récepteurs du LPA	44
b. Voies de transduction du signal.....	45
c. Spécificité de ligand	47
3. Les effets cellulaires du LPA	47

4. L'autotaxine (ATX)	49
a. Famille des NPPs	49
b. Description de la structure/fonction de l'autotaxine	50
c. Gène et isoformes	51
d. Activités de l'autotaxine	52
• Activité catalytique de l'autotaxine : activité lysoPLD	52
• Activité non catalytique d'ATX	52
• Régulation d'ATX	53
5. Axe ATX/LPA et pathologies	53
a. Invalidation de l'axe ATX/LPA : souris transgéniques	53
b. Pathologies associées	55
6. LPA et os	56
a. Cartilage articulation et chondrocytes	57
b. Os et remodelage	57
• LPA et ostéoblastes	58
• LPA et ostéoclastes	59
c. Métastases osseuses	60
7. ATX/LPA et cancer	60
a. Effets cellulaires	60
• Rôle dans la prolifération cellulaire	61
• Rôle dans la mobilité cellulaire	62
• Rôle dans l'invasion cellulaire	63
• Rôle dans la survie cellulaire	64
• Rôle dans l'angiogenèse	64
b. Cancers	65
• LPA	65
• Rôle oncogénique de l'axe ATX/LPA/récepteurs	66
• ATX	66

•LPA ₁	67
•LPA ₂	68
•LPA ₃	68
•Cibles thérapeutiques (inhibiteurs).....	69
PARTIE III : TRAVAIL EXPERIMENTAL	70
A. Objectifs des travaux de recherche	71
B. Travail expérimental n°1 : l'expression de l'autotaxine par les cellules cancéreuses contrôle la formation des métastases osseuses chez la souris suite à l'activation des ostéoclastes par l'acide lysophosphatidique.....	72
1. Introduction.....	72
2. Principales observations.....	73
3. Article n°1	74
4. Discussion	89
C. Travail expérimental n°2 : le récepteur de type 1 de l'acide lysophosphatidique est un facteur prédictif et une cible thérapeutique des métastases issues de cancers du sein.	91
1. Introduction.....	91
2. Principales observations.....	91
3. Article n°2	92
4. Discussion	122
PARTIE IV : DISCUSSION GENERALE - PERSPECTIVES	124
1. Analyses précliniques	125
2. Analyses des mécanismes d'action d'ATX dans le cancer du sein	125
PARTIE V : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES	129
A. Liste des publications :	130
B. Liste des communications à des congrès scientifiques	130
PARTIE VI : REFERENCES	132

Table des illustrations

Figure 1 : Structure d'un os long.	17
Figure 2 : Etapes de la différenciation ostéoclastique.	19
Figure 3 : A) Représentation d'un ostéoclaste mature.	20
Figure 4 : A) Ostéoblastes cultivés sur lamelle osseuse. B) Etapes de la différenciation ostéoblastique.	22
Figure 5 : Représentation schématique des quatre étapes du processus de remodelage osseux : phase de résorption, inversion, formation et quiescence.....	24
Figure 6 : Les deux types de métastases osseuses : a. métastase ostéolytique, b métastase ostéoblastique	27
Figure 7 : Deux types de métastases osseuses après coloration des sections osseuses au trichrome de Goldner.	28
Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes de la cascade métastatique..	29
Figure 9 : Représentation schématique des cercles vicieux impliqués dans le développement d'une métastase ostéolytique.	33
Figure 10 : Représentation schématique d'une métastase ostéoblastique.	38
Figure 11 : Représentation de la molécule de LPA (1 Oleoyl-LPA).....	40
Figure 12 : Représentation de voies de synthèse du LPA.	42
Figure 13 : Voies de signalisation majeures activées par le LPA.....	45
Figure 14 : Domaines de structures des NPPs (NPP1 à NPP7).	50
Figure 15 : Structure des différents isoformes de l'autotaxine.	51
Figure 16 : Les souris invalidées pour LPA4 montrent une augmentation du volume osseux.	59
Figure 17 : Mécanismes d'action du LPA sur les ostéoclastes	59
Figure 18 : Effet de l'inhibiteur de l'autotaxine VPC8a202 sur la dissémination tumorale spontanée des cellules de cancer du sein 4T1.	89
Figure 19 : Effet de l'inhibition de l'expression de l'autotaxine sur l'envahissement tumoral des cellules immunitaires.	126
Figure 20 : Représentation schématique de l'autotaxine contenant les deux domaines de fixation aux intégrines RGD et LDV.....	128

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nomenclatures et spécificités des récepteurs du LPA	47
Tableau 2 : Rôle physiologiques des signaux induits par le LPA	48
Tableau 3 : Substrats des NPPs	49
Tableau 4 : Fonctions biologiques révélées par l'étude des souris invalidées pour ATX et pour les récepteurs du LPA.	55
Tableau 5 : Rôles pathophysiologiques des signaux induits par le LPA	56
Tableau 6 : Marqueurs des cellules immunitaires.	126

Liste des abréviations

AM :	Adrénomédulline
AR :	Androgen Receptor
ATX :	Autotaxine
BMU :	Basic Multicellular Unit
BMP :	Bone Morphogenetic Protein
CFU-GM :	Granulocytes Macrophage Colony Forming Unit
COX-2 :	Cyclooxygenase-2
CRLR :	Calcitonin Receptor like Receptor
CSF1R :	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
CTGF :	Connective Tissue Growth Factor
CXCL-12 :	Chemokine C-X-C motif Ligand 12
CXCR-4 :	Chemokine C-X-C motif Receptor 4
DAG :	Diaglycérol
DKK :	Dickkopf
Dlx5 :	Distal-less homeobox 5
EBV :	Epstein Barr Virus
Edg :	Endothelial differentiation Gene
EGF :	Epidermal Growth Factor
ET-1 :	Endothéline-1
FAK :	Focal Adhesion Kinase
FGF :	Fibroblast Growth Factor
GM-CSF :	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPCR :	Récepteurs couplés à des protéines G
HIF-1α :	Hypoxia-Inducible Factor-1
IFN-γ :	Interferon gamma
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IL :	Interleukine
IP3 :	Inositol-triphosphate
LCAT :	Lecithin-Cholesterol-Acyl-Transferase
LIF :	Leukemia Inhibitory Factor
LPA :	Acide Lysophosphatidique
LPAAT :	LPA-acyltransferase
LPC :	Lysophosphatidylcholine
LPE :	Lysophosphatidylethanolamine
LPP :	Lipide Phosphate phosphatase
LPS :	Lysophosphatidylserine
LysoPLD :	Lysophospholipase D
MAG :	Monoacylglycérol
MAPK :	Mitogen Activated protein Kinase
M-CSF :	Macrophage Colony Stimulating Factor
MCP-1 :	Monocyte Chemoattractant Protein 1

MEC :	Matrice Extracellulaire
MEF :	Mouse embronic Fibroblaste
MIF :	Macrophage migration Inhibitory Factor
MMP :	Matrix Metalloproteinase
MT1-MMP :	Membrane-Type 1 Matrix Métalloproteinase
MSX2 :	Msh homeobox 2
NF-κB :	Nuclear Factor kappa B
NFAT-1 :	Nuclear Factor of Activated T-cells 1
NPP :	Nucléotide Pyrophosphatase Phosphodiesterase
OPG :	Ostéoprotégérine
PA :	Acide Phosphatique
PAI :	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PAP :	Prostatiques Acide Phosphatase
PC :	Phosphatidylcholine
PDGF :	Platelet Derived Growth Factor
PGE2 :	Prostaglandine E2
PIP2 :	Phosphatidylinositol-biphosphate
PKC :	Protéine Kinase C
PLA1/2 :	Phospholipases A1 et A2
PLC :	Phospholipase C
PMA :	Phorbol myristic acetate
PPARγ :	Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma
PPi :	Pyrophosphate Inorganique
PSA :	Prostate-Specific Antigen
PTH :	Hormone Parathyroïdienne
PTHrP :	Parathyroid Hormone-related Protein:
RANK :	Receptor Activator of NF κ B
RANK-L :	Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand
RGD :	Argine-Glycine-Acide aspartique
Runx2/cbfa-1 :	Runt Related Transcription Factor 2
S1P :	Shingosine-1 Phosphate
SMD :	Somatomedine-B Domain
TGF-β :	Transforming Growth Factor- β
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TRIP6 :	Thyroid hormone Receptor-interacting Protein 6
uPA :	Urokinase-type Plasminogen Activator
VCAM-1 :	Vascular Cell Adhesion Molecule 1

PARTIE I : AVANT PROPOS

Une métastase se forme suite à la dissémination d'une cellule tumorale à partir d'un site primaire et à la formation d'une nouvelle tumeur dans un organe distant de celui d'origine. La formation de métastases est la principale cause de décès des patients ayant un cancer. En effet, la prise en charge des patients par des approches chirurgicales ou de radiothérapie permettent d'éliminer de nombreuses tumeurs primaires. Malheureusement, lorsque le cancer est détecté après la formation de métastases, les traitements sont très largement inefficaces [1].

Le squelette est le troisième site le plus fréquent pour le développement de métastases des tumeurs solides après le poumon et le foie. Les métastases osseuses sont des complications fréquentes des cancers du sein, de la prostate, du rein, de la thyroïde et du poumon. Elles sont associées de nombreuses complications sérieuses : douleurs osseuses, fractures pathologiques, compressions médullaires et hypercalcémie [2,3]. Ces complications entraînent une réduction importante de la qualité de vie et posent un problème de santé publique puisqu'elles concernent en France entre 50 000 et 70 000 personnes tous les ans.

Notre laboratoire a montré que l'acide lysophosphatidique (LPA), un lipide biologique, en agissant sur les cellules tumorales via la présence de récepteurs membranaires spécifiques, stimulait la progression tumorale et la formation de métastases osseuses des cellules du cancer du sein, selon un mécanisme impliquant l'activation des plaquettes sanguines [4,5]. L'autotaxine (ATX) est une protéine originairement isolée dans le milieu de culture de cellules de mélanome A2058 qui possède des propriétés pro-métastatiques. On sait à l'heure actuelle que les fonctions biologiques d'ATX résultent de son activité lysophospholipase D (lysoPLD) qui permet de former le LPA. Il a été démontré chez l'animal qu'ATX est responsable du taux de LPA présent dans la circulation sanguine. Nous avons émis l'hypothèse que l'activité lysoPLD de l'autotaxine pourrait être à l'origine du LPA *in vivo*, dans le contexte de la croissance tumorale et de la formation des métastases osseuses.

Mon projet de thèse a consisté à étudier les mécanismes d'action de l'autotaxine et son rôle dans la formation du LPA *in vivo* afin de déterminer si le ciblage d'ATX est une approche thérapeutique d'avenir dans les traitements des patientes atteintes de cancer du sein. Un grand nombre de récepteurs du LPA a été identifié à l'heure actuelle (LPA₁₋₆). Parmi ces récepteurs, une accumulation de données de la littérature supporte l'hypothèse que le récepteur de type 1 (LPA₁) serait impliqué dans la progression de cancers du sein et de leur dissémination métastatique. Cependant des confirmations précliniques et cliniques sont toujours nécessaires. Nous avons donc évalué dans un deuxième temps l'effet pronostic de l'expression de LPA₁ au niveau de tumeurs

mammaires humaines ainsi que l'effet d'un agent pharmacologique (Debio-0719) ciblant LPA₁/LPA₃ dans un modèle préclinique murin de dissémination métastatique spontanée.

Après avoir replacé ce travail dans son contexte bibliographique en présentant l'état des connaissances actuelles sur le tissu osseux, les métastases osseuses des tumeurs solides et l'impact de l'axe ATX/LPA en cancérologie, nous présenterons les résultats obtenus au cours des travaux de thèse et les perspectives qui en découlent.

PARTIE II : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A. La physiologie osseuse

Afin de mieux appréhender les mécanismes complexes impliqués dans la formation des métastases osseuses, il est important de disposer de certaines notions concernant la physiologie osseuse. Nous verrons plus tard que la nature même du tissu osseux influence le devenir des cellules cancéreuses métastatiques présentes dans cet environnement.

Les os sont les éléments principaux du squelette, ils structurent l'aspect extérieur de l'organisme et exercent d'importantes fonctions physiologiques : les os constituent à la fois la charpente du corps sur laquelle les muscles et autres structures pourront se fixer et assurent également une fonction de protection des organes vitaux et du système nerveux central. Les os sont également des acteurs majeurs de la régulation du métabolisme minéral et sont le site principal de l'hématopoïèse [6]. L'os est un tissu complexe, dynamique tant au niveau biochimique que cellulaire. Il est constitué de tissus osseux, hématopoïétique, adipeux, cartilagineux et conjonctif ainsi que de nombreux vaisseaux et nerfs.

1. Le tissu osseux

Il existe trois types d'os, les os longs (fémur, tibia, humérus), les os plats (crâne, omoplate et mandibule) et les os courts (tarses, carpes et vertèbres). Pour décrire le tissu osseux, nous prendrons pour exemple un os long tel que le fémur (figure 1). Il est constitué principalement de trois parties : la diaphyse, les épiphyses et la métaphyse. La diaphyse correspond au cylindre central de l'os. Elle délimite la cavité médullaire contenant la moelle osseuse qui est à la fois un centre de stockage de graisse (la moelle jaune), un milieu hématopoïétique et immunopoïétique (la moelle rouge). La diaphyse est entourée de deux fines enveloppes conjonctives : le périoste, côté externe, contribuant à l'innervation, la croissance et à la cicatrisation de l'os et l'endoste situé le long de la cavité centrale contenant des cellules ostéoprogénitrices et des cellules bordantes. Les extrémités des os longs, recouvertes de cartilage articulaire sont les épiphyses. La métaphyse est située entre la diaphyse et l'épiphyse. D'un point de vue macroscopique, chaque os est constitué à l'extérieur d'une couche dense et lisse, l'os compact, à l'intérieur de laquelle on retrouve une couche poreuse, l'os spongieux.

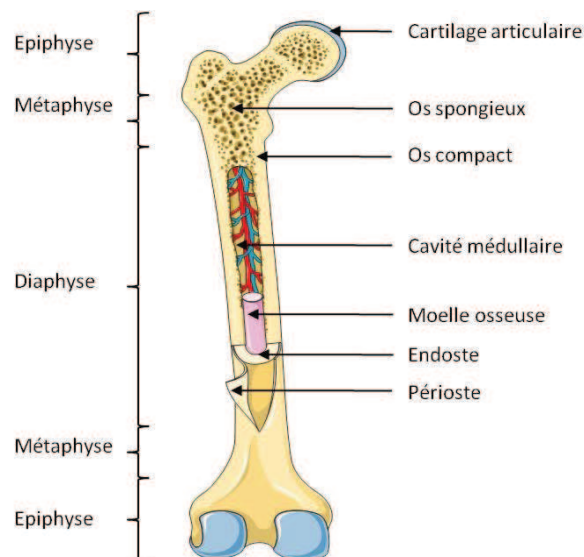


Figure 1 : Structure d'un os long. Les extrémités (épiphyses) des os longs, sont constituées d'os spongieux. La partie centrale (diaphyse) est constituée d'os compact délimitant la cavité médullaire.

2. Composition de l'os

L'os est un tissu conjonctif constitué d'eau (environ $\frac{1}{4}$ du poids de l'os), de matières organiques ($\frac{1}{3}$ du poids sec) et de sels minéraux inorganiques. La partie organique de l'os est constituée des cellules spécialisées (ostéoblastes, ostéoclastes, voir paragraphe A3) et d'une matrice constituée essentiellement de collagène de type 1 et de protéines non collagéniques. Le réseau collagénique fournit élasticité et flexibilité à l'os. La matrice minérale est composée de cristaux d'hydroxyapatite de calcium (ou phosphate tricalcique), des carbonates de calcium et des phosphates de magnésium. Le stockage de cristaux d'hydroxyapatite entre les fibres de collagène confère à l'os sa résistance à la rupture, en plus de sa résistance à l'étirement.

L'interface entre matrice organique collagénique et matrice minérale est assurée par les protéines non collagéniques. Elles représentent 10-15% du contenu protéique osseux et forment un échafaudage pour la minéralisation de la matrice osseuse qui n'est pas encore calcifiée (substance ostéoïde). Environ un quart de ces protéines provient du sérum, principalement représenté par des protéines se liant à la matrice osseuse grâce à leur affinité pour l'hydroxyapatite (albumine et la transferrine). Parmi le reste des protéines non collagéniques produites de façon endogène, on distingue les glycoprotéines, les protéoglycanes et les gla-protéines.

La glycoprotéine la plus représentée du tissu osseux est l'ostéonectine. Elle fournit des sites permettant l'ancrage et la croissance des cristaux d'hydroxyapatite à la matrice osseuse ainsi que la

croissance et la prolifération des ostéoblastes. Il existe aussi des glycoprotéines (ostéopontine, thrombospondine, fibronectine, vitronectine, sialoprotéine osseuse) possédant une séquence Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD) essentielle à la reconnaissance par les récepteurs membranaires de type intégrine [7]. Ces protéines sont impliquées dans la maturation des ostéoblastes et pour certaines dans l'attachement des ostéoclastes aux molécules de la matrice osseuse. Les protéoglycanes, comme le biglycan et la décorine interagissent avec le facteur de croissance TGF- β (Transforming Growth Factor- β) et sont impliquées dans l'agencement des fibres de collagène. Enfin, parmi les gla-protéines identifiées, l'ostéocalcine, sécrétée par les ostéoblastes, favorise la fixation du calcium à la matrice minérale.

3. Les cellules osseuses

L'os est un tissu dynamique en constant renouvellement. Les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes sont les trois acteurs majeurs impliqués dans les mécanismes de remodelage osseux.

a. Les ostéoclastes

Les ostéoclastes sont des cellules très volumineuses dont le rôle majeur est la résorption de la matrice osseuse. Ce sont des cellules possédant 2 à 50 noyaux et mesurant 20 à 100 μ m de diamètre. Ils possèdent un nombre important de mitochondries et de nombreuses vacuoles chargées d'enzymes lysosomiales nécessaires à l'activité de résorption.

- **Ostéoclastogenèse**

Les précurseurs des ostéoclastes sont des cellules souches hématopoïétiques communes aux cellules de la lignée monocyte-macrophages. Le CFU-GM (Granulocytes Macrophage Colony Forming Unit) est le premier précurseur connu de la lignée ostéoclastique [8]. Les cellules ayant entamé leur processus de différenciation quittent la moelle et migrent vers les surfaces osseuses où elles fusionnent pour générer de grosses cellules multinucléées (figure 2). L'ostéoclastogenèse est contrôlée par des facteurs locaux, des hormones circulantes mais également des interactions avec des cellules présentes dans le microenvironnement cellulaire.

Deux facteurs hématopoïétiques sont nécessaires et suffisants pour induire l'ostéoclastogenèse, la cytokine RANK-L (Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B Ligand) et le facteur de croissance M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) [9,10,11]. Le M-CSF est sécrété par les précurseurs ostéoblastiques. Il stimule la prolifération et la survie des précurseurs ostéoclastiques en se fixant sur son récepteur, le CSF1R/cfms (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) et induit la production du récepteur RANK (Receptor Activator of NFκB). Le RANK-L, synthétisé dans l'os par les cellules mésenchymateuses du stroma médullaire et par les ostéoblastes, appartient à la famille TNF (Tumor Necrosis Factor). RANK-L se fixe sur le récepteur RANK ce qui induit une cascade de signalisations impliquant le facteur de transcription NF-κB (Nuclear Factor kappa B). RANK-L stimule la fusion des précurseurs ostéoclastiques et la synthèse de protéines essentielles à l'activation de la résorption osseuse (intégrine $\alpha\beta3$, récepteur à la calcitonine, cathepsine K)[12]. L'OPG (Ostéoprotégérine), membre de la famille des récepteurs du TNF, est un inhibiteur naturel de RANK-L. C'est un récepteur « leurre ». Elle se lie au RANK-L et empêche son interaction avec RANK. L'OPG permet la modulation de l'ostéoclastogenèse. L'OPG est sécrétée sous la forme d'une protéine soluble par les cellules de la lignée ostéoblastique. Elle inhibe la différenciation, la survie et la fusion des précurseurs des ostéoclastes [12,13]. C'est le rapport de sécrétion OPG/RANK-L par les ostéoblastes qui est le contrôle essentiel du processus de résorption osseuse.

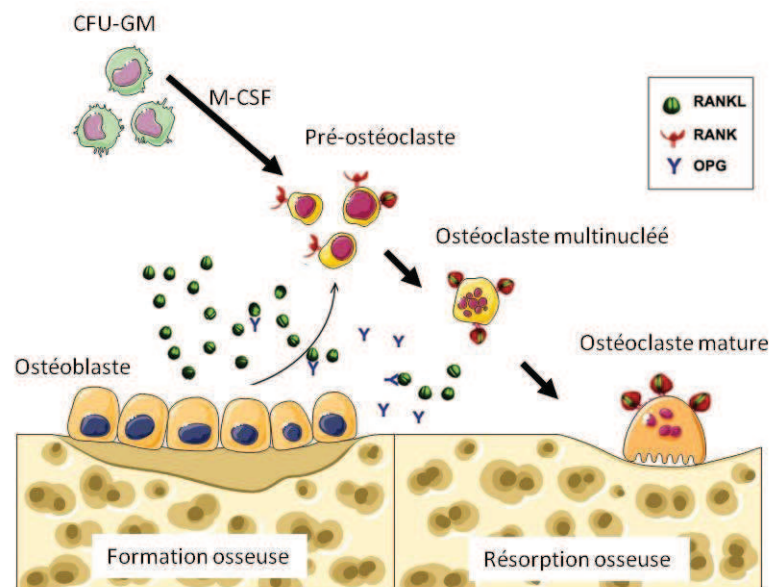


Figure 2 : Etapes de la différenciation ostéoclastique. Les ostéoclastes sont issus de précurseurs de la lignée monocyte-macrophage GFU-GM. Deux facteurs sont essentiels à l'ostéoclastogenèse : M-CSF et RANKL. Ces deux facteurs sont synthétisés par les cellules du microenvironnement osseux et se fixent sur leurs récepteurs respectifs à la surface des pré-ostéoclastes. Ceux-ci fusionnent pour donner des ostéoclastes multinucléés qui se polarisent au contact de l'os. L'OPG produit par les ostéoblastes joue un rôle de régulateur négatif dans la formation des ostéoclastes.

- **Organisation cellulaire**

L'ostéoclaste mature est polarisé. Au contact de l'os, la membrane plasmique de l'ostéoclaste se différencie en deux domaines séparés par un anneau de jonctions entre la cellule et la MEC (matrice extracellulaire) : un domaine apical qui développe une bordure en brosse au contact de la surface osseuse et un domaine basolatéral situé à l'opposé. Un anneau d'actine permet l'isolement d'une chambre de scellement étanche pouvant atteindre un pH de 4.5 (ou lacune de Howship) (figure 3). L'acidité du milieu du compartiment sous ostéoclastique est entretenue par des pompes à protons ATPasiques spécifiques de l'ostéoclaste qui expulsent les ions H^+ . L'ostéoclaste adhère fortement grâce aux interactions entre les intégrines des cellules ($\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha2\beta1$) et les protéines adhésives (ostéopontine, thrombospondine et sialoprotéine osseuse) [14].

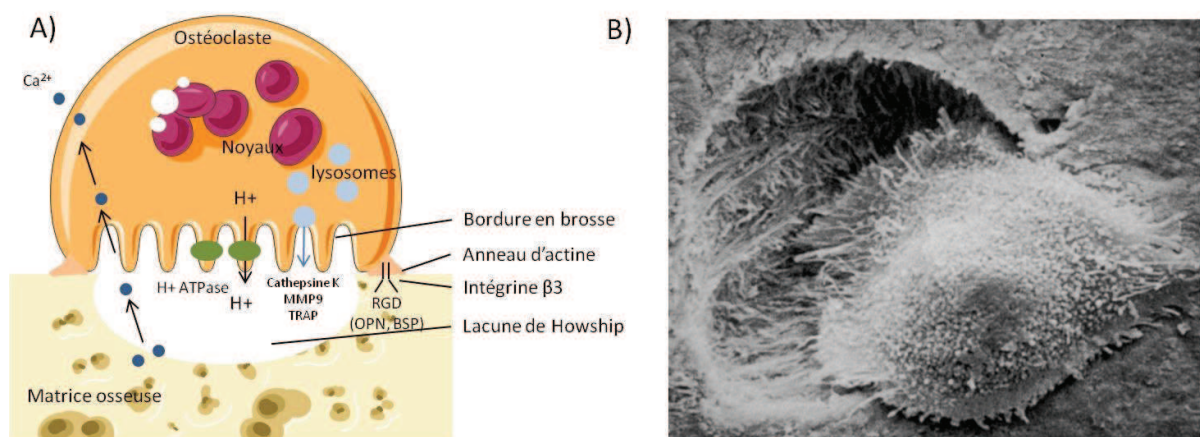


Figure 3 : A) Représentation d'un ostéoclaste mature. L'ostéoclaste s'attache sur les protéines de la matrice osseuse via l'intégrine $\alpha\beta3$. Il se forme une zone scellée, la lacune de Howship dans laquelle la cellule libère des protons (H^+) qui acidifient le compartiment et induisent une déminéralisation de la matrice osseuse. Les ostéoclastes libèrent des enzymes spécifiques (cathepsine K, MMP9...) qui dégradent la trame collagénique de l'os. **B) Ostéoclaste cultivé sur une lamelle osseuse.**

b. Les ostéoblastes

Les ostéoblastes sont des cellules mononucléées cuboïdes ostéoformatrices localisées à la surface de l'os en croissance [15]. Leurs contours sont irréguliers et possèdent des prolongements leur donnant la possibilité de contact avec d'autres ostéoblastes ou avec des ostéocytes par des

jonctions communicantes. Le cytoplasme des ostéoblastes est riche en organites impliqués dans la synthèse protéique et contient un important réticulum endoplasmique, de nombreuses mitochondries, un appareil de Golgi développé et de nombreuses vésicules de sécrétion.

Les différentes étapes de maturation ostéoblastique sont marquées par l'expression des protéines associées d'abord à la synthèse de la matrice organique ou matrice ostéoïde immature (phosphatase alcaline, collagène de type 1) puis par l'expression de marqueurs tardifs associés à la minéralisation osseuse (ostéocalcine, ostéopontine, sialoprotéine osseuse).

Le devenir des ostéoblastes peut se faire selon trois voies : la transformation en ostéocytes en se laissant emprisonner dans la matrice qu'ils synthétisent (10-20%), la mise au repos sous la forme de cellules bordantes tapissant les surfaces osseuses ou la mort par apoptose.

- **Ostéoblastogenèse**

Les pré-ostéoblastes sont issus de la division de cellules souches mésenchymateuses localisées dans la moelle osseuse [16]. L'orientation des cellules mésenchymateuses constitue la première étape de l'engagement vers la lignée ostéoblastique suivie d'une importante étape de multiplication cellulaire associée à l'expression de gènes précoces comme le facteur de transcription Runx2/cbfa-1 (Runt Related Transcription Factor 2) [17]. Certains facteurs comme les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), induisent l'expression de ce facteur de transcription spécifique [18]. Runx2 n'est pas suffisant pour induire l'ostéoblastogenèse, d'autres facteurs régulateurs, comme le facteur de transcription osterix [19] et la β -caténine, les cadhérines membranaires [20] contrôlent le passage du stade préostéoblaste à ostéoblaste (figure 4). Il a été décrit que les facteurs de transcription de la famille AP-1, notamment c-fos, jouent un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération cellulaire au cours des phases précoces de la différenciation [21]. Dlx5 (Distal-less homeobox 5) [22] et MSX2 (Msh homeobox 2) [23] régulent également positivement l'engagement des ostéoblastes vers le processus de différenciation alors que l'expression du facteur de transcription twist est associée à une inhibition de la prolifération de la différenciation ostéoblastique [24].

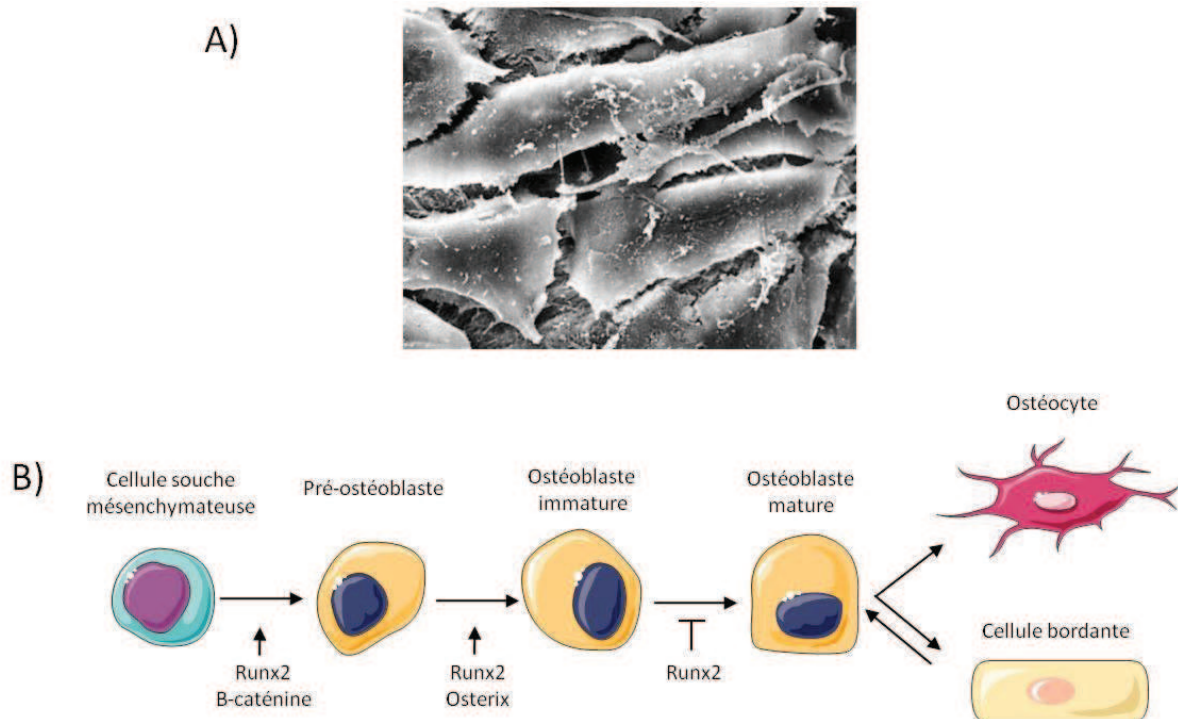


Figure 4 : A) Ostéoblastes cultivés sur lamelle osseuse. B) Etapes de la différenciation ostéoblastique. L'action conjointe de différents facteurs comme la β -caténine, Runx-2 et Ostérix sur les cellules ostéoprogénitrices induit la différenciation d'ostéoblastes matures capables de synthétiser de l'os.

- **La voie Wnt β -caténine**

La voie de signalisation Wnt est essentielle pour la différenciation des ostéoblastes [25,26]. Les protéines Wnt activent la voie de signalisation intracellulaire de la β -caténine via leur liaison à un récepteur à sept domaines transmembranaires de la famille Frizzled [25]. La β -caténine qui est un facteur de transcription entre dans le noyau de la cellule-cible des Wnt et stimule l'expression de gènes spécifiques. Cette voie de signalisation est étroitement contrôlée, en particulier par un inhibiteur extracellulaire appelé DKK1 (Dickkopf 1) qui interagit à la fois avec le co-récepteur LRP et empêche ainsi la dimérisation par Wnt des corécepteurs LRP et Frizzled et l'activation de la voie β -caténine. Une autre protéine, la sclérostine a été décrite comme capable de bloquer la voie canonique Wnt. Lors du remodelage osseux, la sclérostine est exprimée principalement par les ostéocytes et exerce un contrôle négatif sur la formation osseuse, induisant un état de quiescence des ostéoblastes [27]. L'expression de la sclérostine est inhibée par la PTH (hormone parathyroïdienne), ainsi que par la stimulation mécanique de l'os. L'inhibition de la sclérostine chez l'animal avec un anticorps spécifique, induit une augmentation de la masse osseuse [28]. Ceci suggère que la sclérostine peut être une cible intéressante dans le traitement de la fragilité osseuse.

c. Les ostéocytes

Les ostéocytes sont des ostéoblastes différenciés, incapables de se diviser, entièrement entourés par la matrice osseuse minéralisée. Ce sont les cellules les plus abondantes de l'os [29]. Leur corps cellulaire est de plus petite taille que celui des ostéoblastes. Ils siègent dans un système de cavités interconnectées (ostéoplastes) d'où partent des canalicules contenant leurs prolongements cytoplasmiques, fins, nombreux, plus ou moins longs, reliés entre eux par des jonctions communicantes. Ces canalicules reliés forment un réseau dans lequel circule un fluide extracellulaire. Les ostéocytes ont un niveau d'activité métabolique inférieur à celui des ostéoblastes, ils participent au maintien de la matrice osseuse, jouent un rôle dans la transmission des variations de contraintes mécaniques appliquées au tissu osseux, contribuent à l'homéostasie de la calcémie et participent à l'activité des ostéoclastes [30]. Les ostéocytes peuvent rester de longues périodes, jusqu'à plusieurs années, dans les lacunes. Toutefois, l'observation de lacunes vides dans l'os âgé suggère que les ostéocytes peuvent aussi être éliminés par apoptose [31]. Dans d'autres cas, les ostéocytes peuvent être lysés au cours de la résorption osseuse par les ostéoclastes.

4. Le remodelage osseux

Chez l'adulte, 10% du squelette sont renouvelés chaque année. Le remodelage osseux sert à prévenir la dégénérescence des os, réparer les microtraumatismes et permettre la mobilisation rapide de minéraux nécessaires à l'équilibre acido-basique de l'organisme. Au cours du remodelage osseux, l'os ancien est détruit ou résorbé par les ostéoclastes et remplacé par de l'os nouveau par les ostéoblastes. Ce remodelage permanent s'effectue grâce à des unités fonctionnelles de remodelage appelées BMU (Basic Multicellular Unit)[32]. Les activités métaboliques des ostéoclastes et des ostéoblastes sont couplées dans l'espace et dans le temps afin d'adapter la quantité et l'architecture de l'os, en fonction de facteurs systémiques (PTH, Vitamine D) ou locaux.

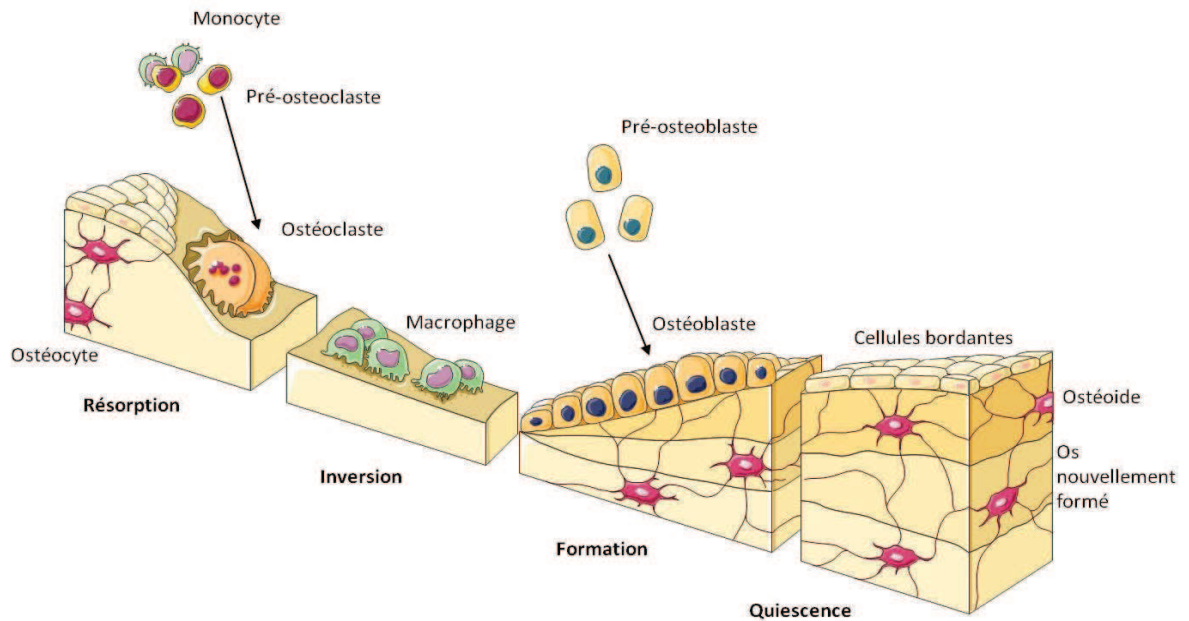


Figure 5 : Représentation schématique des quatre étapes du processus de remodelage osseux : phase de résorption, inversion, formation et quiescence.

Les cellules ostéoclastiques immatures activées fusionnent et se fixent à la matrice osseuse (figure 5). RANK-L exprimé par les ostéoblastes et les ostéocytes se fixe sur les récepteurs RANK des ostéoclastes qui subissent alors une étape de polarisation et amorcent le processus de résorption osseuse. L'ostéoclaste déverse par le biais de la fusion des lysosomes avec la membrane plissée des enzymes protéolytiques dont le fonctionnement optimal est à pH acide (collagénase, cathepsine, métalloprotéases). Ces enzymes détruisent la matrice organique libérant des produits de dégradation du collagène (CTX, NTX) dont le dosage peut être utilisé en clinique afin d'évaluer le niveau de résorption osseuse. La phase d'inversion permet l'arrêt progressif du processus de résorption associé à l'activation de la formation osseuse. La calcitonine, en se liant à un récepteur de la membrane plasmique, a une influence directe sur les ostéoclastes qui se traduit par une rétraction cellulaire et une inhibition de la résorption. En parallèle, les pré-ostéoblastes sont recrutés grâce aux facteurs libérés durant la phase de résorption comme les IGFs (Insulin-like Growth Factors), les FGFs (Fibroblast Growth Factors), le TGF- β , les BMPs et le PDGF (Platelet Derived Growth Factor). Les ostéoblastes entament un processus de différenciation qui s'accompagne de la libération de facteur anti-résorptif comme l'OPG. Les ostéoblastes apposent alors une nouvelle matrice collagénique qui sera secondairement minéralisée.

5. Régulation du remodelage osseux

Plusieurs hormones, notamment les œstrogènes, les androgènes et la vitamine D stimulent la production de matrice osseuse. De nombreux facteurs de croissance sécrétés par les ostéoblastes, stockés dans la matrice osseuse, puis libérés sous forme active lors de la résorption, agissent dans le même sens. La plupart des hormones et les facteurs locaux qui agissent sur les ostéoclastes ont une action sur le système RANKL, RANK et OPG.

La PTH est une hormone sécrétée par les cellules des glandes parathyroïdes. L'action de la PTH sur l'os diffère selon son mode d'administration : une administration en continu favorise la résorption osseuse alors qu'une exposition intermittente augmente la différenciation ostéoblastique. En effet, dans l'os elle se fixe par son extrémité N-terminale aux récepteurs membranaires présents à la surface des ostéoblastes et induit la sécrétion de facteurs solubles comme le M-CSF qui agit sur une cellule souche pour aboutir à un pré-ostéoclaste. Elle inhibe la sécrétion de l'OPG, active l'expression de RANK-L et augmente la résorption osseuse. Paradoxalement, la PTH a aussi un effet anabolique sur l'os en stimulant la prolifération des ostéoblastes : elle convertit les cellules bordantes en ostéoblastes, stimulent l'expression de facteurs de croissance par les ostéoblastes matures (IGF1 et FGF) et inhibe leur apoptose. Ce qui explique son utilisation en clinique (tériparatide, PTH 1-34) dans le traitement de l'ostéoporose [33].

La vitamine D joue un rôle majeur dans l'homéostasie calcique en favorisant la fixation du calcium sur l'os et en diminuant la prolifération des cellules parathyroïdiennes qui sécrètent la PTH. La vitamine D agit sur la différenciation et la maturation des ostéoblastes en stimulant l'expression de gènes ostéoblastiques comme l'ostéopontine et l'ostéocalcine [34]. A doses physiologiques, l'effet est anabolique et les ostéoblastes sécrètent la matrice osseuse. A doses importantes, l'effet est inverse.

La calcitonine est une des rares hormones à avoir une action directe sur les ostéoclastes. Elle mobilise le calcium circulant et le fixe sur le tissu ostéoïde. Son action anti-résorptive passe par une inhibition de la fonctionnalité des ostéoclastes et une accélération de leur apoptose.

Les œstrogènes sont avant tout des inhibiteurs de la résorption osseuse et exercent des effets directs et indirects importants sur les ostéoblastes. Ils ont en plus des effets anti-apoptotiques sur les

ostéoblastes et inhibent la synthèse de l'interleukine 6 (IL6), principale cytokine impliquée dans l'activation de la résorption.

Parmi les cytokines inflammatoires, IL-1 (Interleukine-1) et TNF α augmentent la destruction osseuse en stimulant la synthèse de M-CSF et de RANK-L par les précurseurs ostéoblastiques. L'expression de RANK-L est stimulée également par IL-6 et les glucocorticoïdes. A l'inverse, IL-11 stimule la différenciation ostéoblastique et la formation osseuse par une augmentation de l'action de la BMP-2.

Parmi les facteurs de croissance, les BMPs, le FGF, les IGFs, le TGF- β et le PDGF stimulent la différenciation et la prolifération des ostéoblastes. En dehors de ses effets anaboliques, le TGF- β contrôle la différenciation ostéoclastique en augmentant la production de l'OPG par les cellules stromales et les ostéoblastes.

Le système immunitaire. Les cellules immunitaires existantes dans la moelle osseuse, interagissent avec les cellules de l'os. Les lymphocytes T activés produisent du RANK-L, de l'IL-6, IL-1 et du TNF- α [35]. L'activation anormale du système immunitaire peut mener à la destruction osseuse comme c'est le cas dans l'arthrite rhumatoïde. Le TNF- α stimule l'ostéoclastogénèse alors que les œstrogènes inhibent sa production par les ostéoblastes, les monocytes ou les lymphocytes T. Les souris déficientes pour le TNF- α sont résistantes à l'ostéoporose induite par ovariectomie, confirmant le rôle de cette cytokine dans la stimulation de la différenciation des ostéoclastes [36]. L'inhibition par les œstrogènes de la production de TNF- α par les cellules T a été confirmée *in vivo*, en utilisant des souris *nude*. Ces souris n'ont pas de cellules T et sont comme les souris TNF $^{-/-}$ résistantes à l'ostéoporose induite par ovariectomie [37].

Le système nerveux. Le laboratoire de Gérard Karsenty a démontré que la leptine en se liant à son récepteur hypothalamique inhibe la formation osseuse [38]. Le système nerveux sympathique sert de médiateur afférent à l'action de l'hormone sur le contrôle de la formation osseuse via le récepteur adrénergique β 2 (ADRB2), seul récepteur adrénergique exprimé par les ostéoblastes. Il est montré que des souris dont le gène codant pour le récepteur ADRb2 a été invalidé ADRb2 $^{-/-}$, ont une élévation des marqueurs de la formation osseuse. L'injection de leptine par voie intracérébroventriculaire ne diminue pas la formation osseuse chez ces souris, validant la nécessité d'une intégrité du système sympathique pour relayer les effets de la leptine sur l'os [39].

B. Les métastases osseuses

Il n'y a pas à l'heure actuelle de cellules tumorales capables de dégrader l'os par elles-mêmes. Les métastases osseuses modifient l'intégrité de l'os en perturbant le remodelage osseux. Lorsque l'équilibre est perturbé en faveur de la formation, il y a l'établissement d'une métastase ostéocondensante, comme dans la majorité des métastases de cancers de la prostate. Dans le cas contraire où le déséquilibre du remodelage est en faveur de la résorption osseuse, il y a la formation d'une métastase ostéolytique. Il existe également des formes mixtes des métastases osseuses, avec la présence au même site de formes ostéolytiques et ostéocondensantes [2] (figure 6 et 7).

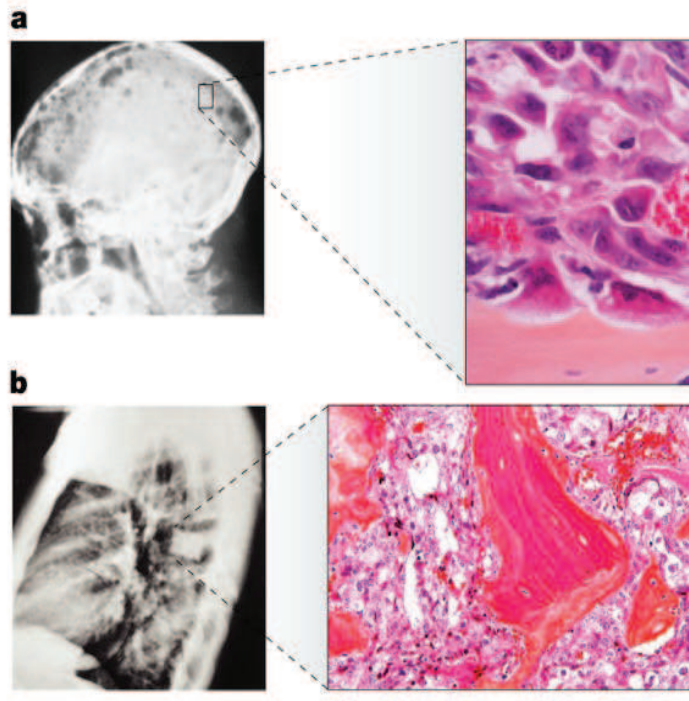


Figure 6 : Les deux types de métastases osseuses : a. métastase ostéolytique, b métastase ostéoblastique [40]

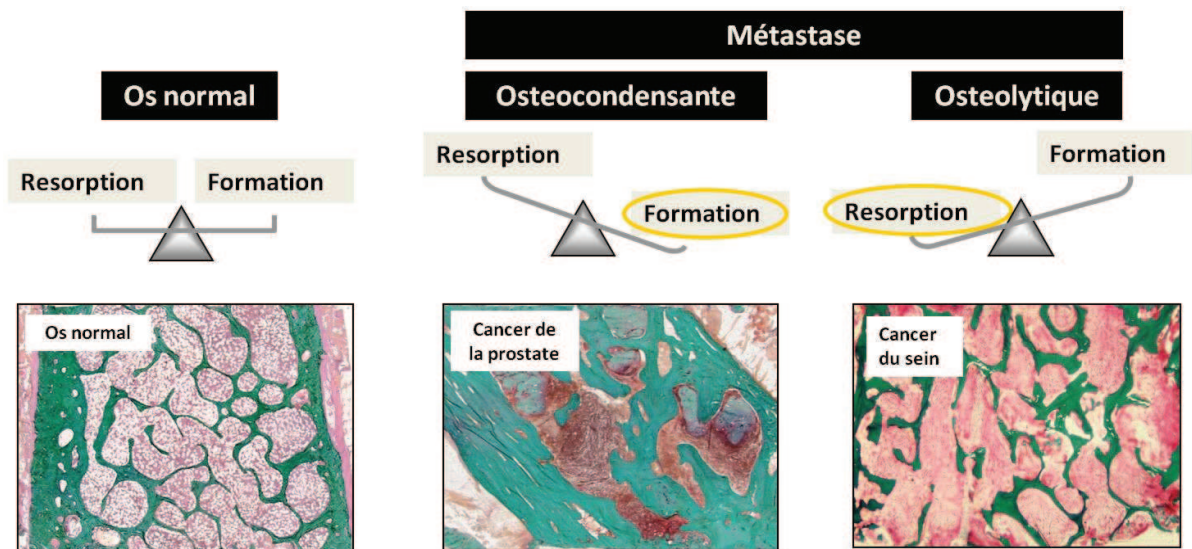


Figure 7 : Deux types de métastases osseuses après coloration des sections osseuses au trichrome de Goldner. L'os minéralisé apparaît en vert et les composants cellulaires de la moelle osseuse en rose. Dans le cas d'une pathologie telle que le cancer de la prostate, le déséquilibre du remodelage osseux est en faveur de la formation osseuse. Il y a alors l'établissement d'une métastase ostéocondensante avec épaissement des travées osseuses. Dans le cas du cancer du sein, le déséquilibre du remodelage osseux est en faveur de la résorption osseuse. Il y a développement d'une métastase ostéolytique avec une destruction importante des travées osseuses.

Au niveau clinique, les métastases osseuses sont associées à une morbidité considérable (fractures pathologiques, compressions médullaires, hypercalcémie et douleurs osseuses) et par conséquent elles détériorent sévèrement la qualité de vie des patients et peuvent même parfois engager leur pronostic vital. Pour toutes ces raisons les métastases osseuses sont un problème de Santé Publique.

Les traitements actuels visent préférentiellement à diminuer la résorption osseuse afin de freiner la progression des lésions osseuses. Dans ce contexte, les biphosphonates sont des agents anti-résorptifs puissants qui ont maintenant une place prépondérante en clinique dans le traitement des métastases osseuses. Toutefois, le traitement est palliatif et ne fait que ralentir la progression des lésions osseuses, il n'améliore pas la survie des patients. Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de traitements curatifs.

1. Le processus métastatique

La dissémination métastatique est un processus qui amène une cellule tumorale unique ou un groupe de cellules présentes dans une tumeur primitive solide à migrer, à s'implanter et à proliférer

dans un organe distant pour former des tumeurs secondaires. La progression métastatique résulte d'étapes multiples, séquentielles et interdépendantes appelées cascade métastatique (figure 8). La dernière étape du processus métastatique correspond à l'invasion, la survie et la prolifération des cellules tumorales dans un nouveau territoire. C'est un phénomène limitant, actif et complexe, peu de cellules y parviennent. La dissémination métastatique au tissu osseux se fait par le biais de la circulation sanguine. Il y a dans l'os et dans la moelle osseuse des conditions particulières qui font que certaines des cellules tumorales vont être spécifiquement attirées et retenues. On verra qu'il a pu être déterminé une signature génique de ciblage osseux des cellules de cancer du sein [41]. L'os est un réservoir de facteurs de croissance incluant le TGF β , les IGF, le PDGF, les BMP et le calcium [42]. Ces facteurs, libérés au cours de la résorption osseuse, fournissent un environnement propice à l'expansion des cellules tumorales.

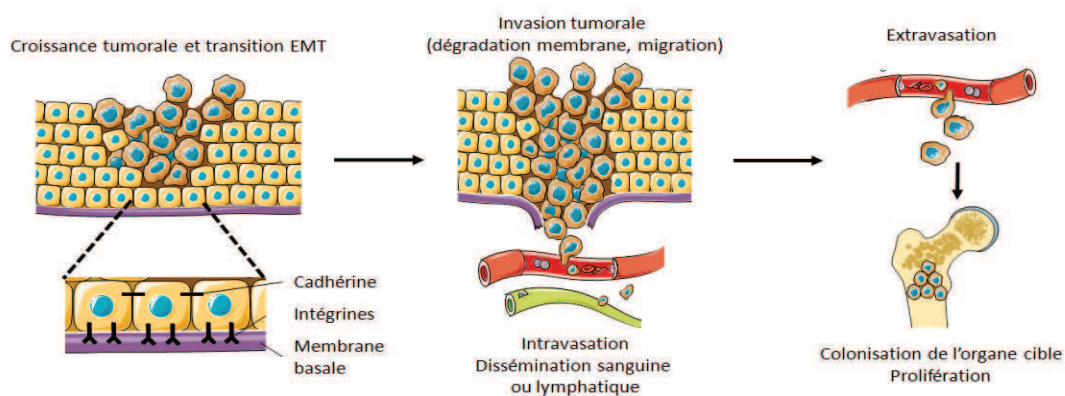


Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes de la cascade métastatique. Des cellules tumorales au caractère métastatique s'individualisent au sein de la tumeur primitive et après une étape d'invasion, intègrent le système vasculaire. Les cellules métastatiques disséminent à un autre organe grâce à la circulation sanguine ou lymphatique. Au niveau de l'organe cible, les cellules métastatiques induisent l'agrégation plaquettaire, facilitant leurs adhésions à la paroi endothéliale et donc l'extravasation. Les cellules métastatiques envahissent alors le nouvel environnement et établissent une nouvelle tumeur.

a. Mécanismes impliqués dans la migration des cellules métastatiques vers l'os

- CXCR-4

Certaines protéines ou chimiokines pouvant être libérées lors de l'ostéolyse ou présentes dans la moelle osseuse sont capables d'influencer le processus de migration des cellules tumorales à l'os. Les cellules métastatiques des cancers du sein et de la prostate qui expriment le récepteur de la

chimiokine CXCR-4 (Chemokine C-X-C motif Receptor 4), appelé CXCL-12/SDF-1 (Chemokine C-X-C motif Ligand 12), migrent préférentiellement vers ces organes [43]. La surexpression de CXCR-4 est détectée dans la tumeur de cancer du sein métastatique comparée aux cellules épithéliales normales [44]. De hauts niveaux d'expression de CXCL-12 sont présents dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la moelle osseuse, qui sont les sites préférentiels de formation de métastases de cancer du sein [44]. La surexpression de CXCR-4 augmente la formation de métastases osseuses *in vivo* [41]. Chez l'animal, CXCR-4 contrôle la croissance et la dissémination métastatique des cancers du sein [45]. Récemment il a été montré que l'inhibition pharmacologique de CXCR-4 par le CTCE-9908 inhibe la dissémination métastatique des cellules MDA-MB-231 au poumon et à l'os démontrant le potentiel thérapeutique du ciblage de CXCR-4 [46].

- **RANKL**

En plus de sa capacité à activer la différenciation des ostéoclastes, il a été montré, que RANK-L est capable d'agir sur les cellules tumorales telles que les MDA-MB-231, DU-145, PC-3 et B16F10 qui expriment RANK et d'induire la migration cellulaire [47]. L'OPG, en bloquant RANK-L, inhibe *in vitro* la migration des cellules de carcinome prostatique DU-145 et PC-3 et, *in vivo*, la colonisation de la moelle osseuse par les cellules de mélanome B16F10 [47]. RANK-L pourrait intervenir non seulement dans la circulation en tant que facteur chimioattractant, des taux circulants de RANK-L ont d'ailleurs pu être détectés dans le sérum de patients atteints de cancers métastatiques [48], mais aussi localement au niveau de la tumeur primitive. Le RANK-L produit au niveau des tumeurs primaires favoriserait donc l'essaimage des cellules tumorales alors que le RANK-L produit par les cellules de moelle osseuse favoriserait l'invasion au site osseux des cellules tumorales qui expriment le récepteur RANK. Toutes ces observations permettent donc de supposer que RANK-L et son récepteur RANK sont également impliqués dans le tropisme osseux des cellules tumorales.

b. Invasion/migration à l'os

- **Les intégrines**

Les cellules tumorales créent des liaisons spécifiques avec la matrice osseuse extracellulaire et les cellules stromales grâce notamment aux intégrines et cadhérines. L'intégrine $\alpha\beta3$ se lie aux

motifs RGD présents sur plusieurs protéines de la matrice osseuse comme la vitronectine, l'ostéopontine, la sialoprotéine osseuse [49,50,51]. Notre laboratoire a montré que la surexpression de cette intégrine augmente la capacité des cellules de cancer du sein à former des métastases osseuses [50,52]. L'activation de la MMP-2 dépendante d' $\alpha v \beta 3$ constitue un facteur supplémentaire permettant l'invasion et la capacité métastatique des cellules tumorales [53].

D'autres intégrines pourraient être également impliquées dans le tropisme osseux des cellules cancéreuses. Par exemple, l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$, en interagissant avec le collagène de type 1, permet la formation des métastases osseuses induites par un sous-clone de la lignée prostatique LNCaP [54]. Les cellules tumorales de myélome qui expriment $\alpha 4 \beta 1$ interagissent avec les cellules stromales de la moelle osseuse via VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1). Le rôle de cette intégrine est sans doute limité dans le processus de métastases osseuses car notamment elle n'est pas exprimée dans les cancers du sein.

- **Les protéases**

Lorsqu'elles arrivent au site osseux, les cellules tumorales peuvent sécréter différentes MMPs qui permettent de dégrader localement la matrice extracellulaire et d'envahir la moelle osseuse. Les études de Kang ont permis de démontrer l'implication de ces protéases dans le processus de formation des métastases osseuses. En effet, ces études ont mis en évidence que des sous-clones ostéophiles de la lignée MDA-MB-231 sur-exprimant la MMP-1 induisent une formation des métastases osseuses plus précocement que les lignées parentales [41]. Il a aussi été démontré que les cellules tumorales à fort tropisme osseux expriment la cathepsine K qui est une cystéine protéase capable de dégrader les fibres de collagène que l'on pensait spécifiques des ostéoclastes [55,56,57,58]. On peut donc supposer que cette protéine produite par les cellules tumorales pourrait permettre la dégradation de la trame collagénique et de favoriser l'invasion tumorale.

c. Ostéomimétisme

Le tissu osseux constitue un environnement hostile pour les cellules métastatiques. Les analyses transcriptomiques et immunohistochimiques faites sur des métastases osseuses suggèrent que les cellules tumorales présentes dans la cavité médullaire, subissent une pression de sélection les amenant à s'adapter à l'environnement osseux en exprimant des gènes qui sont normalement exprimés par les ostéoblastes (cadhérine-11 , connexine-43 , ostéonectine , S100A4, facteurs de

transcription CBF β et Runx2, etc.) [59]. De même, il a été démontré que les cellules tumorales prostatiques (PC-3, DU-145 et C4-2B) expriment Runx-2 et le récepteur Notch-1, permettant la sécrétion de protéines osseuses (ostéopontine, ostéocalcine et sialoprotéine osseuse) et la formation de nodules de minéralisation [60]. Ce phénomène, l'ostéomimétisme, permettrait aux cellules métastatiques de survivre et de progresser plus facilement dans l'environnement osseux.

2. Les métastases ostéolytiques

Les connaissances actuelles indiquent que les métastases ostéolytiques sont le siège d'un cercle vicieux entre destruction osseuse et développement tumoral (figure 9) [3]. En effet, les cellules tumorales produisent de nombreux facteurs, tels que des cytokines et de la PTHrP (Parathyroid Hormone-related Protein) qui stimulent la résorption osseuse par les ostéoclastes, amenant à la libération de calcium et des facteurs de croissance présents dans la matrice osseuse (IGFs, TGF- β) [3]. Ces facteurs vont dès lors agir sur les cellules tumorales en stimulant leur prolifération et la sécrétion de facteurs comme la PTHrP et la PGE2 (Prostaglandine E2) qui vont accentuer l'activité de résorption des ostéoclastes [61].

Notre laboratoire a montré que le site de la métastase osseuse est le siège d'un deuxième cercle vicieux impliquant les plaquettes sanguines et la production de LPA (Acide Lysophosphatidique)(figure 9) [4,62]. Le LPA est un lipide biologiquement actif qui *in vitro* stimule la prolifération, la migration et l'invasion de nombreuses lignées cellulaires, dont des lignées tumorales [63]. Notre laboratoire a démontré qu'en stimulant l'agrégation des plaquettes sanguines, les cellules de cancers du sein induisent la formation de LPA par les plaquettes activées et qu'à son tour le LPA va stimuler la prolifération tumorale et la production des cytokines stimulatrices de la résorption osseuse, IL-6, IL-8 GM-CSF, Gro α et MCP-1 [4,5].

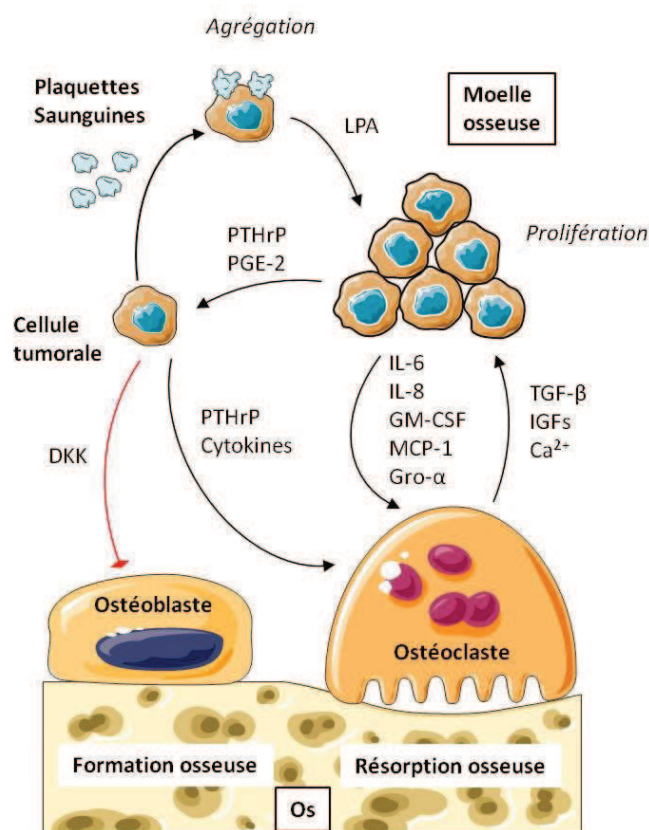


Figure 9 : Représentation schématique des cercles vicieux impliqués dans le développement d'une métastase ostéolytique. Les cellules de cancer du sein produisent différents facteurs (PTHrP, cytokines) qui stimulent la résorption osseuse dépendante des ostéoclastes. La résorption osseuse permet la libération de facteurs de croissance piégés dans la matrice osseuse (IGFs, TGF-β). Certains de ces facteurs vont stimuler la croissance tumorale et la production de PTHrP par les cellules tumorales. Cela induit la formation d'un premier cercle vicieux. Les cellules tumorales présentes dans la cavité médullaire induisent également l'agrégation des plaquettes sanguines et la formation de LPA à partir des plaquettes activées. Le LPA d'origine plaquettaire va alors stimuler la croissance tumorale et la production par les cellules tumorales des interleukines IL-6 et IL-8, de GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) et Gro-α qui vont elles-mêmes amplifier la résorption osseuse dépendante des ostéoclastes.

Les travaux de Kang ont identifié, à partir de cellules dérivant de la lignée humaine de carcinome mammaire MDA-MB-231, des groupes de gènes dont la dérégulation spécifique est associée à la capacité de ces cellules à former des métastases osseuses ou pulmonaires chez les animaux [41]. Parmi les gènes associés à la formation de métastases osseuses on retrouve CXCR-4, MMP-1, la follistatine et des molécules qui stimulent la résorption osseuse telle que le CTGF (Connective Tissue Growth Factor), IL-8 et IL-11. Néanmoins le profil d'expression génique des tumeurs primitives provenant de patientes ayant eu un cancer du sein avec uniquement des métastases osseuses n'a que peu de recoupement avec cette signature génique « osseuse » [59,64]. Par conséquent, le débat concernant le fait qu'une cellule cancéreuse possède dès le stade de la tumeur primaire la capacité à

former une métastase osseuse est encore ouvert. Il est vraisemblable que la formation d'une métastase osseuse soit due à la combinaison à la fois des facteurs génétiques intrinsèques aux cellules tumorales et à une adaptation de ces cellules à l'environnement osseux.

a. Les stimulateurs de la résorption osseuse

- **La protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP)**

La PTHrP est une hormone clé dans la genèse des métastases ostéolytiques [65]. Elle possède une forte homologie avec la PTH lui permettant de reconnaître les mêmes récepteurs et de partager les mêmes activités biologiques [65]. Des études fonctionnelles ont montré que le PTHrP produit localement était le principal médiateur de la résorption ostéoclastique induite par les tumeurs *in vivo* [66,67]. Par la production de RANK-L, la PTHrP sécrétée par les cellules tumorales, stimule l'activité ostéoclastique en inhibant la production d'OPG par les ostéoblastes [68]. L'injection dans des souris immunodéficientes de cellules de cancer du sein MDA-MB-231 ou MCF-7, transfectées pour surexprimer la PTHrP, accélère la formation des métastases osseuses et augmente la surface des plages ostéolytiques [69]. Une activité ostéoclastique accrue, stimulée par le PTHrP dérivé des tumeurs, peut mener à une synthèse accrue de TGF- β par l'os. En retour, les cellules du cancer du sein produisent plus de PTHrP [67].

La PTHrP stimule aussi l'expression d'autres cytokines pro-ostéoclastiques telles que l'IL-6 ou LIF (leukemia inhibitory factor) par les ostéoblastes [70]. Enfin, la PTHrP peut agir de manière autocrine sur les cellules métastatiques en augmentant l'expression du CTGF qui va alors stimuler l'ostéoclastogenèse et la résorption osseuse [71].

Des études cliniques ont montré que le PTHrP était aussi fortement exprimé dans la majorité des métastases osseuses (73 à 92 %) du cancer du sein, alors que seulement 17 à 20 % des métastases non osseuses expriment ce peptide [72,73]. Cependant, il a été montré que l'expression de la PTHrP dans la tumeur primaire n'est pas un facteur pronostique de la survenue de métastases osseuses [74].

- **Les cytokines**

Plusieurs autres facteurs, tels que les interleukines (IL-6, IL-8, IL-11) et le GM-CSF, peuvent être aussi sécrétés par les cellules tumorales présentes dans l'environnement osseux et induire

l'ostéolyse liée à la production de RANK-L, une stimulation de l'ostéoclastogenèse ou à une augmentation de l'activité de résorption des ostéoclastes [65].

De hauts taux d'IL6 et de son récepteur dans le sérum de patients cancéreux ont été montrés associés à un mauvais pronostic et au développement de métastases osseuses. IL-6 agit positivement sur la dégradation osseuse notamment en augmentant la production de RANK-L par les ostéoblastes, en induisant l'expression par les cellules tumorales de plusieurs protéines impliquées dans la résorption osseuse comme la PTHrP, IL-8, IL-11, RANK-L et COX-2 (Cyclooxygenase-2) et en stimulant l'expression de DKK-1, un inhibiteur de la formation osseuse [75]. La surexpression d'IL-11 dans les cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 et MCF-7 induit une augmentation de l'incidence des métastases osseuses chez les animaux [76]. De même, l'IL-11 exprimée dans les tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein corrèle avec la survenue ultérieure de métastases osseuses [77]. Dans leur étude, Park et al, ont mis en évidence que les cellules MDA-MB-231 peuvent induire une ostéoclastogenèse *in vitro*, via l'expression de GM-CSF. L'invalidation génétique de GM-CSF induit une inhibition de la formation des métastases ostéolytiques chez les animaux [78]. Enfin, une étude récente a mis en évidence que le MCP-1 produit par les cellules de cancer prostatique active la différenciation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes capables de résorber l'os [79]. Nous verrons plus tard que le LPA est capable de contrôler l'expression de ces facteurs.

- **Les prostaglandines**

Les cellules de carcinomes mammaires produisent également une autre classe de molécules pro-ostéoclastiques, les prostaglandines. La prostaglandine E2 (PGE2) stimule la résorption osseuse en augmentant l'expression de RANK-L par les ostéoblastes et en inhibant l'expression d'OPG [80]. L'inactivation de COX-2 contrôle l'expression des prostaglandines dans les cellules MDA-MB-231 et bloque la progression des métastases osseuses chez les animaux [80]. Ainsi, un traitement avec des inhibiteurs de COX-2 (NS-398, MF-tricyclic) inhibe la formation des métastases osseuses induites par les cellules tumorales d'origine mammaire [80,81].

- **Le LPA**

D'autres événements cellulaires peuvent survenir au cours de la mise en place de la métastase osseuse conduisant à la production de facteurs pro-ostéolytiques par les cellules tumorales. Nous avons montré que les cellules tumorales présentes dans l'environnement osseux induisent une

sécrétion de LPA par les plaquettes sanguines qui, secondairement, exerce une action mitogène sur les cellules tumorales et stimule la production par ces cellules des facteurs pro-ostéolytiques IL-6 et IL-8 [4,5]. Cette partie sera développée un peu plus loin dans le paragraphe C6.

b. Les inhibiteurs de la résorption osseuse

Le remodelage osseux est une balance, il y a un couplage entre formation et résorption osseuse. La progression d'une métastase ostéolytique indique qu'il y a un découplage entre les deux activités. Il a été montré dans ce cas que les cellules métastatiques peuvent inhiber la différenciation des ostéoblastes en agissant simultanément sur les voies de signalisation dépendantes des Wnts et BMPs. La protéine DKK-1 est un antagoniste de la voie Wnt qui inhibe la différenciation ostéoblastique [82]. DKK-1 est également exprimée dans la plupart des adénocarcinomes mammaires hormonaux-indépendants ainsi que dans une lignée humaine hormonaux-indépendante de cancer du sein MDA-MB-231 qui induit des lésions ostéolytiques chez les animaux [83]. Les cellules tumorales (sein, prostate) capables d'induire des lésions ostéolytiques chez les animaux produisent non seulement DKK-1, mais également un facteur soluble Noggin [84]. Noggin est une protéine antagoniste des BMPs qui interagit directement avec les BMPs ou leurs récepteurs présents à la surface des ostéoblastes [85,86]. Noggin inhibe les voies de signalisation conduisant à l'expression des facteurs de transcription Runx-2 et ostéix induites et donc la différenciation ostéoblastique [83].

D'un point de vue clinique, il a été montré que les taux circulants de DKK-1 sont augmentés chez les femmes ayant un cancer de sein et des métastases osseuses ainsi que dans d'autres situations cliniques caractérisées par une ostéolyse importante comme la polyarthrite rhumatoïde. Ces données suggèrent que DKK-1 pourrait être utilisé comme facteur pronostique des pathologies osseuses ostéolytiques [87,88].

c. La contribution du tissu osseux

Le tissu osseux contribue directement à la croissance tumorale en libérant lors de l'ostéolyse des facteurs tels que les IGFs, le TGF- β et du calcium ionisé [65]. L'augmentation de la concentration en calcium dans l'environnement osseux stimule la prolifération des cellules tumorales [89], la résorption osseuse via la surexpression de la PTHrP par les cellules tumorales [90] et l'ostéoclastogenèse grâce à la translocation nucléaire du NF κ B [91]. Le TGF- β lorsqu'il est libéré se

fixe à des récepteurs de haute affinité dits de type II présents à la surface des cellules permettant d'activer la voie de signalisation dépendante des protéines Smads et l'expression de protéines pro-ostéoclastiques (PTHrP, IL-8, IL-11, PGE2) [80]. Il a été démontré que la transfection d'un récepteur T β RII dominant négatif inhibe l'expression de PTHrP par le TGF- β , *in vitro*, et inhibe le développement des métastases osseuses induites par les cellules tumorales MDA-MB-231 [67]. De plus, l'invalidation de Smad4 ou la surexpression de Smad7 (inhibiteur des protéines Smad2/3) dans les cellules tumorales, bloque l'expression de PTHrP et d'IL-11 et inhibe la formation des métastases osseuses *in vivo* [92,93].

Les protéines du remodelage osseux peuvent aussi avoir un rôle dans le développement des métastases ostéolytiques. En effet, on constate une accélération de la résorption osseuse issue des cellules de cancer du sein chez les animaux déficients en calcium ou en vitamine D [94,95,96]. Récemment, la déficience en vitamine D a été identifiée dans une étude épidémiologique comme un facteur à risque pour la progression des cancers du sein [97].

3. Les métastases ostéoblastiques

Les métastases ostéoblastiques sont la résultante d'une formation osseuse anarchique. Elles peuvent provoquer des compressions médullaires et des paralysies [2]. Les biopsies osseuses révèlent une augmentation de l'épaisseur et de la connectivité des travées osseuses mais en général cette formation est de mauvaise qualité avec une quantité accrue d'ostéoïde (figure 7). Les cellules tumorales présentes dans la cavité médullaire sécrètent des facteurs qui stimulent la formation osseuse et inhibent la résorption osseuse. Certaines molécules comme l'ET-1 (Endothéline-1) et le TGF- β sont de puissantes stimulatrices de la formation osseuse et jouent un rôle prépondérant dans la pathogenèse des métastases ostéoblastiques (figure 10) [98]. D'autres facteurs pro-ostéoblastiques comme les BMPs ont aussi été identifiés comme participant au processus d'ostéocondensation des métastases osseuses [83,99]. L'AM (Adrénomédulline) est un peptide vasodilatateur multifonctionnel sécrété par les cellules cancéreuses. Elle se fixe aux récepteurs CRLR (Calcitonin Receptor like Receptor) couplés aux protéines G et induit des effets mitogéniques sur les ostéoblastes [100,101].

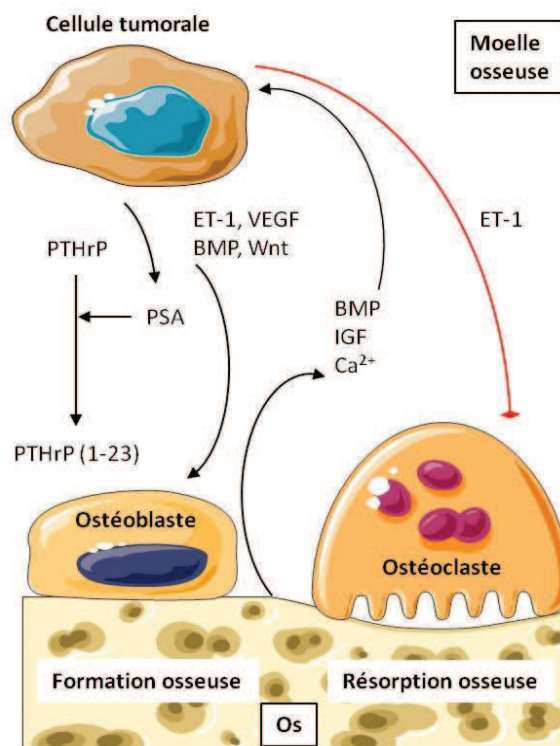


Figure 10 : Représentation schématique d'une métastase ostéoblastique. Les cellules tumorales produisent de l'ET-1 et un fragment de la PTHrP (1-23) qui activent les ostéoblastes et inhibent les ostéoclastes. En retour, les IGFs et les BMPs stimulent la prolifération des cellules tumorales et la production d'ET-1.

a. Endothéline-1

Les endothélines sont impliquées dans la progression de nombreuses tumeurs (prostate, ovaire etc.) [102]. Au niveau d'une métastase osseuse, ET-1 stimule à la fois la prolifération des ostéoblastes et inhibe l'activité des ostéoclastes [98]. Les patients atteints de métastases osseuses ostéoblastiques issues de cancer de la prostate montrent des taux sériques élevés d'ET-1 [103]. L'administration d'un antagoniste spécifique du récepteur de l'endothéline-1 réduit la survenue de métastases osseuses ostéoblastiques dans un modèle murin et réduit la morbidité chez les hommes atteints d'un cancer prostatique avancé [103,104]. L'endothéline-1 serait capable de jouer sur la voie de signalisation Wnt en supprimant son inhibiteur DKK-1 entraînant une augmentation de la différenciation des ostéoblastes [105]. De plus l'ET-1 est capable de stimuler directement la prolifération des cellules tumorales qui possèdent elles aussi des récepteurs à l'ET-1 [106].

b. PSA et PTHrP

La PSA (Prostate-Specific Antigen) participerait également à la physiopathologie des métastases ostéoblastiques. La PSA est une protéase pouvant cliver la PTHrP générant un fragment mitogène capable de protéger les ostéoblastes de l'apoptose mais incapable de stimuler les pré-ostéoclastes, bloquant ainsi la résorption osseuse induite par la tumeur [83]. La PSA est aussi capable d'inhiber la sécrétion de RANK-L, de stimuler la production d'OPG par les ostéoblastes et d'induire l'apoptose des précurseurs ostéoclastiques [107,108]. Enfin on retrouve des taux circulants élevés d'OPG chez les patients ayant un cancer de la prostate associé à des métastases ostéocondensantes suggérant que cet inhibiteur de RANK-L pourrait intervenir dans la formation de ce type de métastases en bloquant l'ostéoclastogenèse [106].

c. Autres facteurs

La formation des lésions ostéoblastiques est précédée par une phase de résorption osseuse qui conduit à la libération d'un grand nombre de facteurs de croissance (TGF- β , IGFs, PDGF). En plus de son activité mitogène sur les cellules tumorales, le TGF- β régule également l'expression de Runx-2 et d'ET-1 [83]. Le PDGF, le VEGF et les IGFs synthétisés par les cellules tumorales ou présents au site osseux exercent également une action positive sur les ostéoblastes et participent à l'établissement de métastases ostéocondensantes [83,101]. A titre d'exemple, les cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 transfectées pour exprimer PDGF-BB vont former des métastases mixtes au lieu d'induire uniquement des lésions ostéolytiques [109]. On va aussi constater une diminution de la formation des métastases ostéoblastiques induites par les cellules prostatiques C4-2B dès lors que l'on traite les animaux avec un inhibiteur d'un récepteur du VEGF [110].

On peut aussi envisager que l'axe ATX/LPA pourrait être aussi impliqué dans la formation des métastases ostéoblastiques. En effet les ostéoblastes sont capables de répondre au LPA. Cette partie sera développée dans le paragraphe C6.

C. Autotaxine (ATX) et acide lysophosphatidique (LPA)

1. L'acide lysophosphatidique

L'acide lysophosphatidique (1- or 2-acyl-sn-glycerol-3-phosphate) est le plus simple des phospholipides. Durant plusieurs décennies, le LPA ne fut considéré que comme un intermédiaire métabolique de la synthèse des phospholipides membranaires. La première démonstration que le LPA est un lipide bioactif a été réalisée par W. Vogt. Son étude a montré que ce phospholipide était impliqué dans l'effet vasoconstricteur induit par des extraits d'intestin de grenouille sur des cellules musculaires lisses de lapin [111]. Il fut rapidement montré que les voies de signalisation activées par le LPA résultaient de la mise en jeu de récepteurs à la surface de la cellule [112,113]. Le premier récepteur ne fut cloné qu'en 1996 [114]. En 1986, l'équipe de Tokumura a été la première à reporter que le LPA était produit dans le plasma par une enzyme appelée lysophospholipase D (lysoPLD) [115]. Puis quelques années plus tard, deux groupes ont identifié la lysoPLD comme étant l'autotaxine à partir du plasma humain et du sérum de veau fœtal [116,117].

a. Structure biochimique du LPA

Le LPA est constitué d'un squelette glycérol possédant un groupement hydroxyle en position sn-2 (ou sn-1), un groupement phosphate libre en position sn-3, et un acide gras en position sn-1 ou (sn-2) (figure 11). Derrière le terme LPA se cache en fait toute une série d'analogues structuraux qui diffèrent par la longueur de la chaîne carbonée et le degré de saturation de cette même chaîne [118].

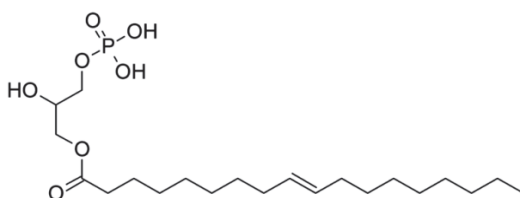


Figure 11 : Représentation de la molécule de LPA (1 Oleoyl-LPA).

Dans le sérum et le plasma, le LPA n'est pas sous forme libre, mais associé à des protéines de transport telles que l'albumine ou à la gelsoline et aux lipoprotéines de faibles densités [119,120]. La différence d'affinité du LPA pour ces protéines génère probablement une diversité dans sa

biodisponibilité. Cela permet d'envisager l'hypothèse que, dans l'organisme, l'activité du LPA puisse être régulée par ces protéines en fonction des besoins physiopathologiques. Les enzymes impliquées dans la synthèse et la dégradation du LPA sont sans aucun doute capables, elles-aussi, de contrôler sa biodisponibilité et son action physiologique.

b. Production de l'acide lysophosphatidique

Les plaquettes activées, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les adipocytes, les microvésicules des érythrocytes et certaines cellules cancéreuses sont aussi à l'origine de la production de LPA [63,121,122]. Le LPA peut être formé à partir de différents précurseurs incluant la LPC (lysophosphatidylcholine) [116], le PA (Acide Phosphatique) [123], et le MAG (Monoacylglycérol) [124] (figure 12).

- **Production de LPA par l'autotaxine (ATX)**

La concentration sérique de LPA est de l'ordre du micromolaire (5 μ M) [122]. Il a été montré que l'autotaxine est à l'origine du LPA présent dans la circulation sanguine. Le sérum et le plasma dépourvus d'autotaxine présentent une production de LPA complètement absente [125,126]. L'équipe d'Umezo-Gotto, en 2002, a montré que grâce à son activité lysoPLD, l'autotaxine hydrolyse le LPC, permettant la libération du groupement choline et la formation de LPA [116]. Le LPC semble être le substrat majeur de l'autotaxine. Il est libéré notamment par les plaquettes activées [127] et est retrouvé en abondance, surtout sous une forme liée à l'albumine, dans divers liquides biologiques contenant aussi du LPA : sérum ($\geq 200 \mu$ M), ascites, liquide folliculaire, milieux extracellulaires [128,129,130]. Le LPC est aussi détecté dans le milieu de culture de cellules tumorales [116]. Dans le plasma, le LPC est synthétisé principalement à partir de la PC (Phosphatidylcholine) contenue dans les lipoprotéines sous l'action de la LCAT (Lécithine-Cholestérol-Acyl-Transférase) et de la PLA1 (phospholipase A1) [127,131]. Le foie sécrète aussi du LPC insaturé, qui est synthétisé par la PLA1 [132].

- **Production de LPA par les phospholipases**

Les PLA1 et PLA2 hydrolysent la chaîne d'acide gras du PA en position sn-1 ou sn-2 respectivement pour former du LPA [123,133,134]. Le PA est présent dans les microvésicules

membranaires. Il est généré à partir de phospholipides ou de diacylgcérol par la phospholipase D (PLD) ou la diacylgcérol kinase (DGK) respectivement. L'implication d'une phospholipase dans la production extracellulaire de LPA nécessite la présence de PA sur le feuillet externe de la membrane plasmique ou dans le milieu extracellulaire. Dans des conditions normales, le PA se trouve majoritairement sur le feuillet interne de la membrane plasmique [135]. Par contre dans des conditions inflammatoires, les membranes de certaines cellules (plaquettes, érythrocytes) peuvent subir de profonds remaniements (flip-flop, production de micro vésicules), rendant le PA accessible [131].

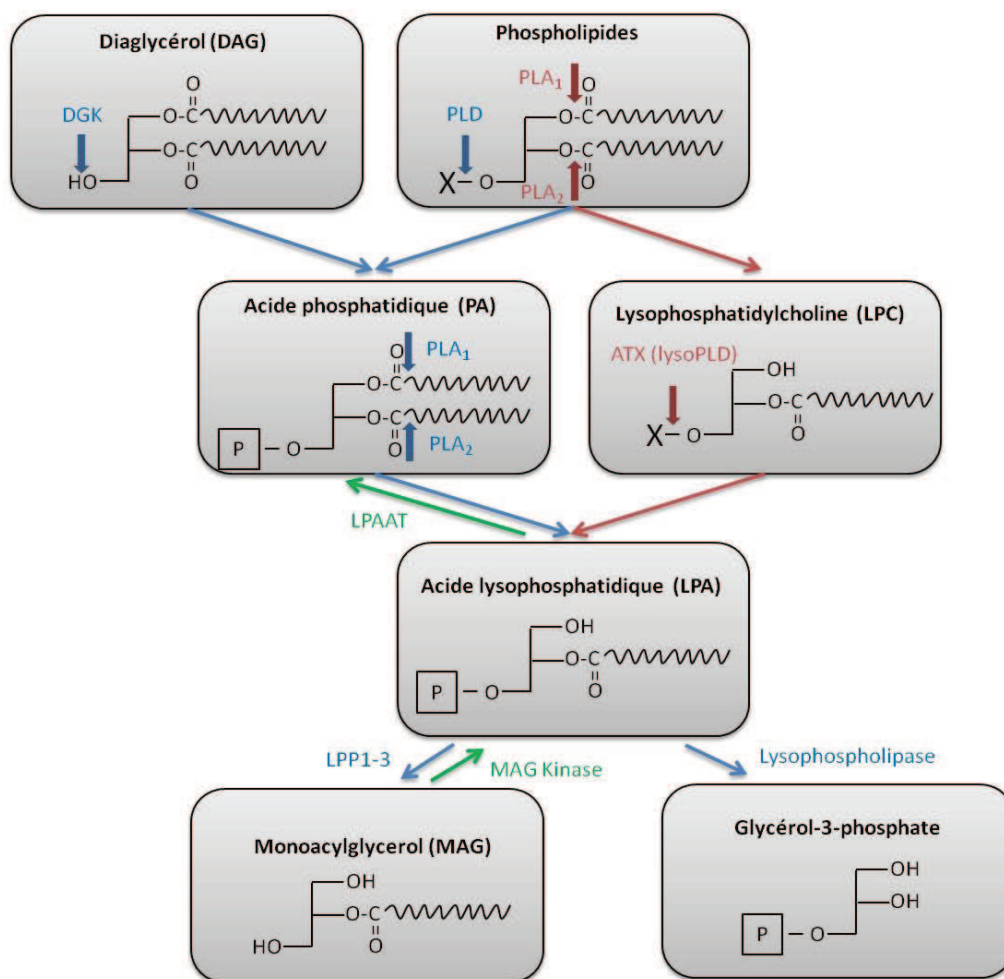


Figure 12: Représentation de voies de synthèse du LPA. Le LPA peut être produit soit à partir de PA sous l'action de la PLA₁ ou de la PLA₂, soit à partir de LPC sous l'action de l'autotaxine qui possède une activité lysoPLD (P : groupement phosphate, X : groupement choline).

c. Dégradation du LPA

Parallèlement à sa synthèse, le LPA subit également un catabolisme intense. Le LPA peut être dégradé en MAG par des phosphatases mais peut aussi être converti en PA sous l'action de la LPAAT (LPA-acyltransferase) et en glycérol-3-phosphate sous l'action de lysophospholipases spécifiques du LPA comme celle purifiée à partir du cerveau de rat [136,137].

Deux classes de phosphatases hydrolysent le LPA : les LPPs (Lipides Phosphates phosphatases) et les PAPs (Prostatiques Acide Phosphatase) [138,139]. Une dérégulation de ces protéines a été décrite dans le cadre de cancers ovariens et de la prostate [140,141]. La très grande majorité (plus de 90 %) de l'hydrolyse du LPA correspond à sa déphosphorylation par des LPPs. Une modification de leur expression ou de leurs activités se traduisent par une variation de l'activité biologique du LPA [142]. Par exemple la surexpression de LPP3 dans le cancer ovarien inhibe la formation de colonies et cet effet est contrebalancé par un analogue du LPA non hydrolysable [141]. De plus, les concentrations de LPA dans le plasma sont élevées chez les souris hypomorphiques LPP1 (Ppap2a^{tr/tr}). La demi-vie du LPA plasmatique est d'environ 12 minutes chez les souris hypomorphiques LPP1 et de 3 minutes dans les souris contrôles [143]. Ceci démontre que LPP1 serait impliquée dans le rétrocontrôle du LPA circulant. Cependant les souris transgéniques qui sur-expriment LPP1 développent de nombreux problèmes organiques mais pas d'altération du niveau de LPA circulant [144].

2. Les récepteurs du LPA

La multiplicité d'action du LPA sur une grande variété de cellules peut s'expliquer par le fait que ce lysophospholipide est capable de se lier à un grand nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire. La plupart des actions du LPA passe par des GPCR (Récepteurs couplés à des protéines G) spécifiques du LPA. Le premier récepteur décrit fut identifié et cloné par le groupe de Jerold Chun qui, en recherchant les récepteurs couplés aux protéines G impliquées dans le développement du cortex cérébral dans l'embryon de souris, a découvert un récepteur orphelin dont l'expression était restreinte à la zone ventriculaire (vzg-1) [114]. Actuellement, un panel important de récepteurs avérés ou potentiels du LPA a été décrit incluant le récepteur de type nucléaire PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma) (tableau 1) [145].

a. Structure et distribution des récepteurs du LPA

A l'exception de PPAR γ , tous les récepteurs du LPA sont constitués de sept domaines transmembranaires, une extrémité N terminale extracellulaire et une extrémité C terminale intracellulaire. Ils se lient à des protéines G de type hétérotrimérique ($\alpha\beta\gamma$) par leur domaine cytoplasmique. Le troisième domaine semble jouer un rôle important dans cette fixation. En fonction de la composition en acides aminés des domaines cytoplasmiques, le récepteur va pouvoir interagir avec différentes sous-unités α (G_s , G_i , G_q et G_{12}) et permettre l'activation de multiples voies de signalisations intracellulaires (décrites dans le paragraphe suivant) (figure 13). Les récepteurs du LPA peuvent être divisés en deux groupes : les récepteurs de la famille Edg (Endothelial differentiation Gene) et les récepteurs purinergiques.

Le premier récepteur de la famille Edg, LPA $_1$ a été appelé Edg-2 de part sa forte homologie de séquence avec un récepteur orphelin spécifiquement exprimé par les cellules endothéliales lorsqu'elles sont activées par le PMA (phorbol myristic acetate), Edg-1. Depuis cette famille de récepteurs membranaires s'est agrandie incluant aussi des récepteurs pour un autre lysophospholipide, la S1P (Sphingosine-1 Phosphate) qui présente une structure voisine de celle du LPA. Les récepteurs spécifiques du LPA de la famille Edg (LPA $_1$ /Edg2, LPA $_2$ /Edg4, LPA $_3$ /Edg7) possèdent des domaines transmembranaires très homologues (86%). LPA $_1$ est exprimé dans la plupart des tissus et de façon relativement importante au niveau du système nerveux et du cœur. LPA $_2$ est exprimé principalement dans les poumons, les reins et le système nerveux alors que LPA $_3$ est surtout retrouvé au niveau du cœur, du cerveau, des poumons, des organes reproducteurs et du rein [146].

La deuxième famille des récepteurs au LPA est apparentée à la famille des récepteurs purinergiques, capables d'être stimulés par des nucléotides tels que l'ATP et l'ADP. Parmi ceux-ci LPA $_4$ /P2Y $_9$ est exprimé au niveau des ovaires, du cerveau, du pancréas et du thymus et semble être impliqué dans l'embryogenèse [147,148]. LPA $_5$ /GPR92 est exprimé à un niveau basal dans de multiples tissus [149]. Récemment, d'autres GPRC orphelins ont été publiés comme nouveaux récepteurs du LPA : LPA $_6$ /P2Y $_5$, GPR87, P2Y $_{10}$ et GPR35 [150,151,152,153]. LPA $_6$ /P2Y $_5$ est le seul récepteur du LPA à être impliqué directement dans une pathologie humaine régulant la croissance des cheveux [151]. GPR87 et P2Y $_{10}$ augmente la mobilisation du calcium intracellulaire [150,152]. P2Y $_{10}$ présente la particularité de se lier potentiellement au LPA et à S1P [150].

Le LPA semble aussi être un ligand du récepteur intracellulaire PPAR γ déjà décrit pour lier d'autres médiateurs lipidiques [154]. La stimulation de PPAR- γ par le LPA a été montrée liée à la prévention de l'endotoxémie dans les organes [155]. Cependant la réalité physiologique de la liaison du LPA au PPAR γ est controversée.

b. Voies de transduction du signal

Les récepteurs membranaires du LPA activent un grand nombre de voies de transduction du signal en fonction de la nature des protéines G auxquelles ils sont couplés (G_q , G_i , G_s , $G_{12/13}$) (figure 13) [145]. LPA $_1$ et LPA $_2$ se couplent et activent trois types de protéines G : G_i , G_q et $G_{12/13}$ [157,158,159,160]. LPA $_3$ se lie avec G_i et G_q mais pas à $G_{12/13}$ [158]. La surexpression de LPA $_4$ dans les cellules induit des changements morphologiques au travers de l'activation de la voie de signalisation $G_{12/13}$ [147,161], l'accumulation intracellulaire de l'AMPc à travers G_s , l'activation de Rho et la mobilisation du calcium à travers G_q et G_i [147,161]. Le LPA induit une rétractation des neurites et des fibres de stress dans les cellules exprimant LPA $_5$ couplé à $G_{12/13}$ et une activation des niveaux de calcium par G_q [149], une augmentation de l'AMPc et du phosphate inositol [149,162].

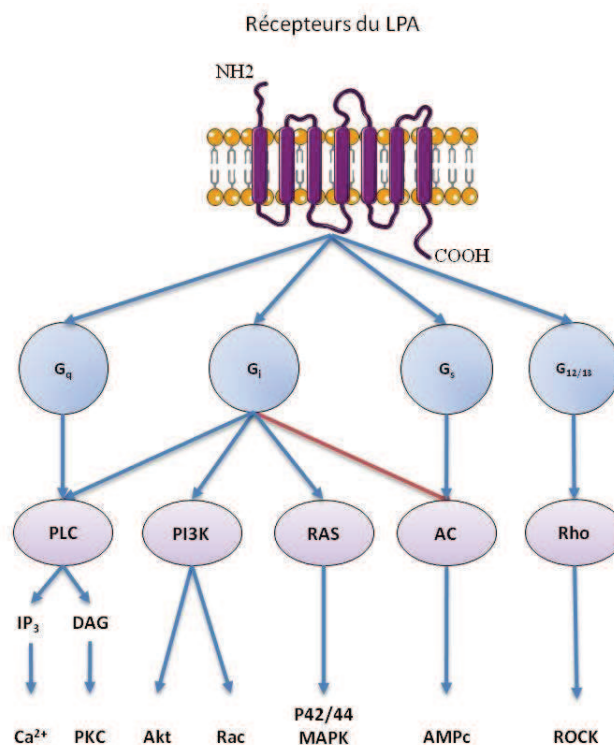


Figure 13 : Voies de signalisation majeures activées par le LPA. Le LPA transmet ses signaux par l'intermédiaire de récepteurs liés à quatre protéines G hétérotrimériques (G_q , G_i , G_s , $G_{12/13}$), qui elles-mêmes activent les petites protéines G (Rac , Ras , Rho), la phospholipase C (PLC), l'adhénylate cyclase (AC) et AKT , conduisant à la migration, la prolifération, la contraction et la survie cellulaire.

L'activation de la protéine trimérique G_q stimule la PLC (Phospholipase C) qui hydrolyse le PI_2 (Phosphatidylinositol-biphosphate) libérant du DAG (Diacylgérol) et l' IP_3 (Inositol-triphosphate) qui vont agir comme seconds messagers, notamment en induisant une élévation du calcium intracellulaire et l'activation de la PKC (Protéine Kinase C). Une augmentation des concentrations en calcium cytoplasmique induit divers stimuli comme l'activation de nombreuses protéines dont la calmoduline et la PKC dont les activités sont impliquées dans des processus variés tel que l'apoptose, le cycle cellulaire et l'expression de gènes. Les récepteurs G_q peuvent aussi induire la prolifération cellulaire. En effet l'activation de la PLC, Ca^{2+} ou PKC est généralement suffisante pour induire la prolifération cellulaire. L'interaction avec la protéine G_i permet l'activation des petites protéines G , Ras et Rac amenant à l'activation de la cascade des MAPK (Mitogen Activated protein Kinase) réglant la prolifération cellulaire et la migration cellulaire, respectivement. De plus, l'activation de la protéine G_i régule également l'activité de la phospholipase B (AKT) qui contrôle la survie cellulaire et induit l'inhibition de l'adénylate cyclase. Le LPA peut aussi activer la protéine de type G_s , augmentant de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique, par une voie dépendante de l'activation de l'adénylate cyclase [163]. Enfin les récepteurs du LPA sont capables d'activer la protéine $G_{12/13}$ et par l'interaction avec le facteur Rho-GEF d'induire l'activation de la petite protéine G RhoA et induire la contraction cellulaire et donc la mobilité cellulaire [164]. Bien que la signalisation, passant par RhoA, soit considérée comme la plus relevante pour induire le contrôle du cytosquelette d'actine, elle peut aussi collaborer avec Ras au niveau de la progression du cycle cellulaire.

A l'énoncé de l'ensemble des voies de signalisations mobilisées par l'interaction du LPA avec ses récepteurs, on se rend compte de la complexité de l'activité biologique du LPA. Cependant ce n'est pas tout. En effet, il existe un deuxième niveau de complexité dans les effets cellulaires induits par le LPA. En plus de son rôle en tant que médiateur extracellulaire, le LPA peut agir également comme messenger intracellulaire en activant des récepteurs nucléaires. Le LPA peut notamment se lier à $PPAR\gamma$ et induire la transcription de gènes impliqués dans le remodelage vasculaire [154]. Enfin, il a également été montré que le récepteur LPA_1 peut être transloqué dans le noyau où grâce à sa fixation au LPA, il pourrait réguler la transcription de protéines impliquées dans l'inflammation comme la COX-2 et la nitrique oxyde synthase [165].

Dans un contexte approprié, ces voies de signalisation sont capables d'interagir les unes avec les autres pour réguler la différenciation, la mobilité, la prolifération et la survie cellulaire en activant de nombreux gènes précoces et tardifs. Il est intéressant de garder à l'esprit que l'existence d'une cellule dépourvue de récepteur du LPA est virtuellement impossible.

c. Spécificité de ligand

La structure du LPA varie selon sa composition en acide gras [166]. Dans le sérum plus de 80% du LPA présent sont sous forme insaturée [167]. Les espèces de LPA biologiquement actives sont celles qui contiennent un acide gras à chaînes longues (C16 à C18)[168]. Les formes de LPA avec un acide gras insaturé sont plus actives que les saturées [166].

La forme du LPA semble influencer sa liaison avec les différents récepteurs (tableau 1). PPAR- γ est exclusivement activé par les formes insaturées. LPA₃, LPA₆ et GPR35 semblent préférentiellement reconnaître la position de l'acide gras sur le squelette glycérol (sn2>sn1). LPA₃ ne répond pas à toutes les formes de LPA mais possède une forte affinité pour le 2-acyl-LPA contenant des acides gras insaturés [133,163]. Le LPA₄ a la plus grande affinité pour le LPA 18 :1 [169].

Cette affinité spécifique des récepteurs pour différentes formes de LPA laisse penser qu'il existe encore un niveau supplémentaire de complexité tissu/organe spécifique dans les signalisations induites par le LPA en fonction de la prévalence de tel ou tel type de récepteur.

Récepteurs	Gène localisation	Affinités du LPA
LPA1 (VZG-1, EDG2, GPR26)	LPAR1/9q32	18:2>18:3>20:4>18:1> 16:0>18:0
LPA2 (EDG4)	LPAR2/19p12	18:3>20:4>18:2 =18:1>18:0>16:0> 0:0
LPA3 (EDG7)	LPAR3/1p22.3-p31.1	18:3>18:2>18:1>20:4>18:0>16:0
LPA4 (GPR23, P2Y9)	LPAR4/Xq13-q21-1	18:1>18:0>16:0>14::0
LPA5 (GPR92, GPR93)	LPAR5/12p13.21	16:0>18:3>18:2>18:1=16:0=20:4
LPA6 (P2Y5)	LPAR6/13q14	18:2>sn2-18:1>sn1-18:1>20:4>18:0>16:0>14>0
GPR87 (GPR95, FKSG78)	GPR87/3q24	18:1
P2Y10	P2YR10/Xq21.1	18:1 , S1P
GPR35		Sn2-18:2>sn2-18:1>sn2-20:4>sn1-18:1
PPAR γ		LPA insaturés

Tableau 1 : Nomenclatures et spécificités des récepteurs du LPA [166]

3. Les effets cellulaires du LPA

Le LPA exerce une très grande diversité d'activités sur une très large variété de cellules, l'impliquant dans un nombre important de processus physiologiques (tableau 2) [170]. Certaines des activités du LPA sont rapides et indépendantes de la synthèse protéique telles que le changement

morphologique, la mobilité, la chimiotaxie, l'invasion cellulaire. D'autres ont des effets à plus long terme car ils sont liés à la transcription de gènes tels que la stimulation du cycle cellulaire, l'augmentation de la viabilité, la production de facteurs de croissance (VEGF), d'interleukines (IL6 et IL8) qui peuvent agir comme facteurs autocrins ou paracrins sur les cellules elles-mêmes ou sur l'environnement [63].

Rôles physiologiques du LPA	
Système nerveux	<u>Développement :</u> Prolifération et différenciation des cellules progénitrices neurales Neurogenèse, survie neuronal <u>Myélination</u> Prolifération des astrocytes Différenciation des oligodendrocytes Changement morphologique, prolifération, survie des cellules de Schwann
Système vasculaire	<u>Vasculogenèse/ angiogenèse</u> Hémorragie du cortex frontal dans LPA1-/- et LPA1-/-LPA2-/- Défaut sévère de vascularisation dans les KO ATX Maintient de la vascularisation <u>Vasorégulation :</u> Hypertension et hypotension Mort des cellules endothéliales Perte de l'intégrité vasculaire
Système immunitaire	<u>Fonctions des cellules T :</u> Chemotaxie, Production de cytokines, Apoptose Trafficking (ATX) <u>Fonctions des cellules dendritiques :</u> Maturation, Chemotaxie
Système reproductif	<u>Implantation de l'embryon :</u> Implantation dans l'espace et le temps Régulation des voies de synthèse de la prostaglandine <u>Spermatogenèse :</u> Survie des cellules germinales Mobilité des spermatozoïdes

Tableau 2 : Rôle physiologiques des signaux induits par le LPA [170]

4. L'autotaxine (ATX)

L'autotaxine est une glycoprotéine identifiée comme un facteur de mobilité autocrin de 125 kDa dans le milieu conditionné des cellules de mélanome A2058 humain par l'équipe de Mary L. Stracke [171]. Les niveaux d'expression de l'autotaxine sont très variables en fonction des différents tissus chez l'homme. Les expériences de northern blotting montrent que l'expression la plus élevée d'ARNm pour l'autotaxine est retrouvée dans le cerveau, le placenta, les ovaires, l'intestin grêle et les tissus adipeux. Un niveau d'expression plus faible est détecté dans la prostate, les testicules, le pancréas, le côlon, le poumon et les reins, et le niveau d'expression d'autotaxine le plus bas est observé dans le cœur et le foie [172]. L'autotaxine est abondamment exprimée dans différents fluides comme le plasma, le sérum, l'urine, les fluides séminaux et les fluides cérébrospinaux.

a. Famille des NPPs

L'autotaxine, appelée aussi NPP2, appartient à la famille des NPPs (Nucléotides Pyrophosphatases Phosphodiesterases). Cette famille est composée de 7 membres (NPP1-7) (tableau 3). En règle générale, les NPPs hydrolysent les ponts pyrophosphates et phosphodiesteres des nucléotides tels que l'ATP et leurs dérivés. L'autotaxine se distingue des autres protéines de cette famille car c'est la seule à posséder une activité lysoPLD permettant la synthèse de LPA à partir du LPC [132,173].

Protéines	Substrats
NPP1 (PC-1, MAFP, NPPase, NPPy)	Nucléotides et dérivés
NPP2 (Autotaxine, PD-1 α , NPP α)	Nucléotides et dérivés, LPC
NPP3 (gp130 ^{RB13-6} , B10, PD-1 β , NPP β , CD203C)	Nucléotides et dérivés
NPP4	Nucléotides et dérivés
NPP5	Nucléotides et dérivés
NPP6	Choline phosphate esters, LPC, Glycerophosphorylcholine
NPP7 (alk-SMase)	LPC, Sphingomyelin

Tableau 3 : Substrats des NPPs [174]

Les NPPs ont des structures très similaires avec un large domaine catalytique (figure 14). Les membres de la famille des NPPs montrent 40-50% d'acides aminés identiques dans leurs domaines extracellulaires. L'autotaxine, contrairement aux autres membres de la famille des NPPs, est une

protéine sécrétée. Elle possède un domaine hydrophobique en N-terminal, qui fonctionne comme un peptide signal. L'autotaxine est synthétisée sous la forme d'une pré-pro-enzyme par clivage du peptide signal suivi par un second clivage par des pro-protéines convertases telles que les furines au site de clivage spécifique (Arg-Ile-Lys-Arg, acides animés de 32 à 35) [175,176]. Elle est ensuite exportée de façon classique et sécrétée comme une glycoprotéine active. Il a aussi été suggéré que la partie C-terminale de l'autotaxine serait impliquée dans sa sécrétion puisque les mutants pour lesquels les douze derniers acides animés ont été supprimés ne sont pas sécrétés [177].

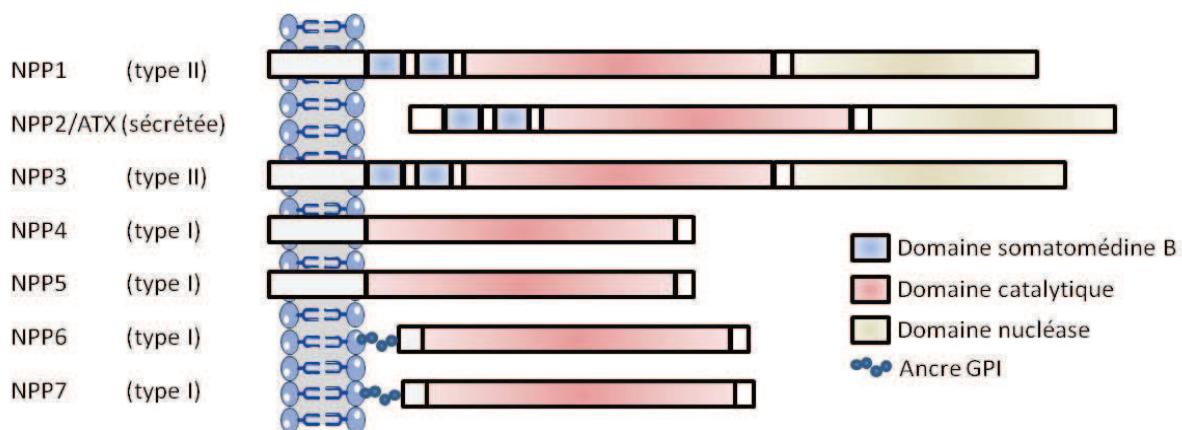


Figure 14 : Domaines de structures des NPPs (NPP1 à NPP7). Les sept NPPs possèdent un domaine catalytique structurellement similaire. NPP1 et NPP3 ont une orientation de type II (dirigés vers l'extérieur de la cellule) alors que NPP4 à 7 sont de type I (dirigés vers l'intérieur de la cellule). NPP2/ATX est la seule protéine sécrétée de cette famille [178]

b. Description de la structure/fonction de l'autotaxine

La séquence primaire de l'autotaxine permet de prédire la présence de deux domaines somatomedine-B (SMD) riches en résidus cystéines dans sa partie N-terminale (figure 14). Le premier domaine présente plusieurs résidus similaires aux domaines somatomedine-B de la vitronectine essentiels à la fixation de PAI (Plasminogen Activator Inhibitor 1) cependant il semblerait que les domaines SMD d'ATX ne présenteraient pas d'affinité pour PAI [179]. Le domaine catalytique de l'autotaxine (environ 400 acides animés) responsable de l'activité lysoPLD et phosphodiesterase présente des similarités avec le domaine catalytique des phosphatases alcalines [173,180]. Des études ont montré que la mutation d'un seul acide animé, la thréonine 210, entraînait la perte des deux activités [181]. Le domaine nucléase d'ATX, situé en C-terminal est structurellement similaire celui de certaines endonucléases mais ATX ne possède pas d'activité nucléasique. Il contient un domaine MORPHO avec un motif EF-hand fonctionnant indépendamment de l'activité d'ATX

[182,183], et pouvant inhiber l'adhésion des oligodendrocytes à la matrice extracellulaire [182]. Les motifs EF-hand sont considérés comme les plus communs des motifs liant le calcium aux protéines [184] mais l'activité catalytique d'ATX dépendant des cations divalents est indépendante de ce motif [185].

L'autotaxine est une protéine glycosylée et le niveau de glycosylation semble jouer un rôle important dans son activité. L'autotaxine est N-glycosylée en trois sites : N410, N524, et N542 [186,187]. La glycosylation N524, un résidu conservé du domaine catalytique, est essentielle pour l'activité d'ATX. La structure tridimensionnelle de l'autotaxine est aussi importante. La N542 serait importante dans la stabilisation de l'interaction entre le domaine catalytique et le domaine nucléase [186]. Un pont disulfure entre C413 et C805 semble aussi être important pour l'activité catalytique de la protéine [177].

c. Gène et isoformes

Chez l'homme, le gène codant pour l'autotaxine est composé de 27 exons. L'épissage alternatif de ce gène conduit à la formation de trois isoformes différents dans leur localisation d'expression (figure 15). La forme la plus abondante, **ATXt**, est composée de 863 acides aminés et est identique à la lysoPLD du plasma. Elle a été originairement isolée à partir des cellules humaines de tétartocarcinome NterD1 [172]. La deuxième forme, **ATXm**, est exprimée essentiellement par les cellules de mélanome. Elle est composée de 915 acides aminés grâce à une insertion très basique de 52 acides aminés au niveau du domaine catalytique. La signification physiologique de cette insertion reste inconnue mais fait apparaître un site protéase (KVAPKRR) en position 341 qui pourrait rendre la protéine très instable [172,188]. Le troisième isoforme, **PD1-α**, la moins exprimée, est composé de 888 acides aminés grâce à une insertion de 24 résidus à côté du domaine nucléase. Elle est localisée dans le cerveau au niveau des oligodendrocytes [189,190].

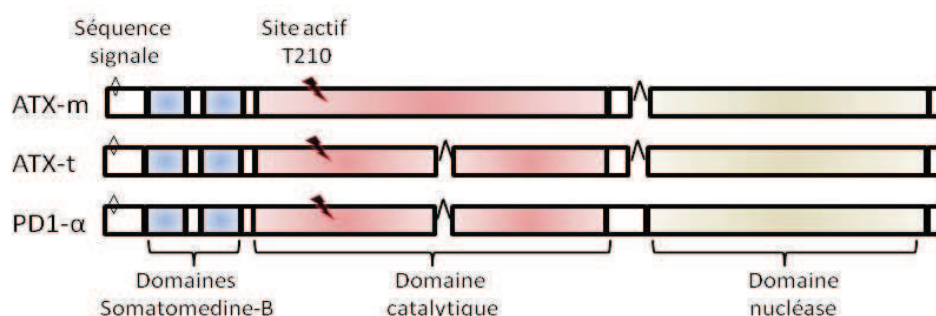


Figure 15 : Structure des différents isoformes de l'autotaxine. Les isoformes d'ATX sont composées de deux domaines somatomedine-B, d'un domaine catalytique contenant le site actif en position T210 et d'un domaine nucléase.

d. Activités de l'autotaxine

- **Activité catalytique de l'autotaxine : activité lysoPLD**

L'autotaxine est une phospholipase D mais elle diffère des formes classiques par l'absence de motif HDK, le centre catalytique des PLD classiques, important dans l'hydrolyse du PC [115,116]. L'équipe d'Umezo-Gotto, en 2002, a montré que grâce à son activité lysophospholipase D, l'autotaxine hydrolyse la LPC permettant la formation de l'acide lysophosphatidique (LPA) [116]. L'affinité d'ATX pour le LPC est supérieure aux nucléotides suggérant que le LPC est le substrat physiologique préférentiel d'ATX [116]. L'autotaxine a été décrite comme étant la source majeure de formation de LPA dans le sérum. En effet, les souris hétérozygotes pour l'inactivation d'ATX montrent une diminution d'environ 50% de l'autotaxine et de la production du LPA circulant [125,191]. De plus, la déplétion de l'autotaxine dans des souris sera entraînée une absence d'activité lysoPLD et de production de LPA dans ceux-ci [125,126].

In vitro l'autotaxine hydrolyse aussi le sphingosylphosphorylcholine pour produire de la S1P (shingosine 1 phosphate), un autre lysophospholipide médiateur de diverses activités biologiques [192]. Cependant la réalité physiologique *in vivo* de la production de S1P par ATX est discutable. En effet les souris invalidées pour l'autotaxine ne présentent aucune diminution du S1P circulant [191]. Dans des conditions anhydres, l'autotaxine peut aussi produire du PA cyclique, un analogue du LPA à partir de LPC en utilisant le résidu hydroxy en position sn-2 [126]. Le cPA est un constituant du sérum humain, et joue un rôle antiprolifératif et anti-invasif sur les cellules cancéreuses [193].

- **Activité non catalytique d'ATX**

L'autotaxine possède une activité non catalytique à travers son domaine MORPHO. Ce domaine inhibe l'adhésion des oligodendrocytes aux protéines matricielles comme la fibronectine et facilite leur maturation [183]. Le domaine MORPHO entraîne la déphosphorylation de la Tyr 925 de FAK (Focal Adhesion Kinase) et stimule la redistribution de la paxilline et de l' α -actinine au niveau des complexes d'adhésion focaux. Les effets sur la distribution de la paxilline peuvent être mimés par un peptide représentant la région EF hand loop, suggérant que le motif EF est suffisant et nécessaire pour les effets du MORPHO domaine [182,185]. Les adhésions focales permettent le lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Pour contrôler le remodelage cellulaire, les adhésions focales sont en constant remaniement [194]. L'autotaxine par son domaine MORPHO régule la

dynamique des adhésions focales et des oligodendrocytes. Est-ce que cette activité est spécifique des oligodendrocytes ou peut-elle être étendue à d'autres types cellulaires est une question qui reste ouverte.

- **Régulation d'ATX**

L'autotaxine circulante connaît un rapide renouvellement, son expression est stimulée par certains facteurs de croissance comme l'EFG (Epidermal Growth Factor), le FGF, la BMP-2 et Wnt-1 et est inhibée par le TGF- β , IL-1, IL-4 et IFN- γ (Interferon gamma) [145,195]. L'autotaxine est aussi régulée dans les cancers. Par exemple dans le cas du cancer du sein, Chen et coll. ont observé que l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ régulait l'expression de l'autotaxine en agissant sur le facteur de transcription NFAT-1 (Nuclear Factor of Activated T-cells 1) [196]. Lors la transformation des fibroblastes de poulets par l'oncoprotéine v-Jun, une forme mutante de c-Jun, il a été montré que parmi les gènes dont l'expression est modifiée, celui de l'autotaxine présente le niveau d'augmentation d'expression le plus élevé (107 fois) [197].

5. Axe ATX/LPA et pathologies

a. Invalidation de l'axe ATX/LPA : souris transgéniques

Les souris invalidées pour le gène de l'autotaxine ne sont pas viables et meurent au stade embryonnaire 10.5 dû à leur incapacité à former leurs propres vaisseaux sanguins au niveau du sac embryonnaire, du placenta et de l'embryon lui-même [198,199,200]. Aucune des invalidations des récepteurs du LPA (LPA₁, LPA₂, LPA₃, LPA₄) ne montrent cette létalité (tableau 4). Cependant les souris *LPA1*^{-/-} montrent une létalité périnatale de 50% certainement due à des défauts olfactifs entraînant des problèmes d'allaitement. Le double KO LPA₁/LPA₂ et le triple KO LPA₁/LPA₂/LPA₃ sont aussi viables [201,202]. Ceci suggère que l'action d'ATX sur la formation de nouveaux vaisseaux passe par d'autres récepteurs. Récemment, il a été décrit que les souris *LPA4*^{-/-} montreraient un phénotype ressemblant au KO de l'autotaxine avec des défauts du développement du sac embryonnaire [203]. Cependant contrairement à l'invalidation de l'autotaxine, certains de ces animaux sont viables ce qui suggère la mise en place de mécanismes d'adaptation chez les animaux viables.

Les souris *LPA1*^{-/-} présentent des dimorphismes craniaux-faciaux et ont une taille réduite mais sont fertiles. L'inactivation de *LPA₁* entraîne des retards dans le développement cérébral et une augmentation de l'apoptose des cellules de Schwann du nerf sciatique [204,205,206]. Une petite partie des embryons développe une exencéphalie (environ 5%), une hémorragie céphalique frontale (2.5%) et des défauts sévères de développement cortical. Compte tenu de leurs comportements, ces animaux constituent également un modèle d'étude pour la schizophrénie [207]. Les souris *LPA1*^{-/-} développent moins de fibrose rénale et pulmonaire que les souris sauvages démontrant l'importance de ce récepteur dans ces pathologies [208,209].

Les animaux *LPA2*^{-/-} ne semblent pas avoir de phénotype majeur. Les études révèlent que l'inactivation de ce récepteur conduit à des effets anti-apoptotiques et protecteurs contre les irradiations aux rayons X. Les souris hétérozygotes pour *LPA₂* montrent une diminution de production de la PGE2 par les cellules épithéliales de la trachée en réponse au LPA pouvant impliquer *LPA₂* dans le développement des inflammations allergiques des voies respiratoires [210].

La double inactivation des récepteurs *LPA₁* et *LPA₂* ne génère pas de phénotype essentiellement différent de l'inactivation du seul récepteur *LPA₁* hormis une exacerbation des hématomes frontaux [201]. Cependant, l'analyse de la sensibilité au LPA de fibroblastes issus d'embryons de ces souris, montre que la double inactivation *LPA₁/LPA₂* est nécessaire pour entraîner une perte complète de l'effet du LPA sur certaines réponses cellulaires (production d'inositol phosphate, mobilisation du calcium, activation de la synthèse d'ADN) [201]. Ainsi, bien que le récepteur *LPA₂* ne soit pas essentiel au développement de la souris, il semble agir de façon redondante avec le récepteur *LPA₁* pour transmettre le signal LPA. Enfin ces souris sont partiellement protégées contre les hyperplasies néointimales induites, ce qui suggère que ces récepteurs ont un rôle dans la migration des cellules musculaires lisses dans un contexte de pathologie vasculaire.

Les souris *LPA3*^{-/-} sont viables mais les femelles montrent des défauts dans leur système reproducteur. L'inactivation de *LPA₃* entraîne une forte diminution de la COX-2 conduisant à une implantation embryonnaire retardée, un espacement embryonnaire altéré, une hypertrophie placentaire et une diminution de taille des portées [211]. Malgré l'expression de *LPA₃* dans le cortex frontal, l'hippocampe et les amygdales, aucun phénotype n'a été reporté dans le système nerveux à l'heure actuelle [163].

Récemment une étude a montré que les souris *LPA4*^{-/-} développent des défauts de vascularisation, entraînant une létalité partielle des embryons durant la gestation. L'étude des animaux viables à l'âge adulte a mis en évidence des défauts de néo-vascularisation par les cellules endothéliales. Ces résultats indiquent que LPA₄ régule la structure et la fonction des vaisseaux [203]. Les souris LPA₄ semblent aussi avoir un phénotype osseux, avec une augmentation du volume trabéculaire. LPA₄ inhibe la différenciation ostéoblastique (voir paragraphe C6b) [212]. LPA₄ agit contrairement aux autres récepteurs en tant qu'inhibiteur de la migration et de l'invasion des MEF (mouse embryonic fibroblaste) en réponse au LPA [213].

Gènes	Phénotypes KO/mutations	Fonctions biologiques révélées	Ref
Lpa1	50% létalité périnatale	Douleur neuropathique	[204,205,2
	Réduction de la taille	Fibrose pulmonaire et rénal	09,214,215
	Dysmorphisme cranio-facial	Prolifération des astrocytes	,216,217,2
	Réduction du poids du cerveau	Migration des cellules MEF	18,219]
	Défaut de succion	Différenciation neuronale	
	Augmentation d'apoptose des cellules de Schwann	Trouble bipolaire	
	Défaut du développement cortical		
Lpa2	Pas d'anormalité	Différenciation neuronale	[201,217]
		Signalisation des cellules MEF	
Lpa3	Problème d'implantation embryonnaire		[220]
Lpa4	Létalité embryonnaire partielle (défaut de vascularisation)	Inhibition de la migration des MEF	[203,212,213]
	Augmentation du volume trabéculaire osseux	Inhibition de l'ostéoblastogenèse	
P2Y5		Croissance capillaire	[151]
ATX	Létalité embryonnaire (défaut de vascularisation)		[125,191]

Tableau 4 : Fonctions biologiques révélées par l'étude des souris invalidées pour ATX et pour les récepteurs du LPA.

b. Pathologies associées

L'étude de souris invalidées pour le gène de l'autotaxine ou des récepteurs LPA₁, LPA₂, LPA₃ et LPA₄ a permis de mieux caractériser l'importance du LPA dans certains processus pathologiques. La première fonction biologique identifiée du LPA était son action sur l'agrégation plaquettaire [121,168]. Depuis ce jour le LPA a été décrit pour réguler plusieurs autres processus d'ordre

neuronal, vasculaire, reproductif mais aussi dans la douleur, le processus cancéreux, l'obésité et la fibrose [170]. Une liste non exhaustive est présentée dans le tableau 5.

Pathologies	Rôles pathologiques du LPA
Désordres neuronaux	Désordre psychiatrique Désordre bipolaire Développement
Désordres neuropathiques	Initiation des douleurs neuropathiques Myélination/démyélination
Maladies cardiovasculaires	Survie/contractibilité des myocytes cardiaques Hypertrophie Formation néointimal
Désordres reproductifs	Lieu et moment de l'implantation Spermatogenèse Survie des cellules germinales
Cancers	Invasion, migration Survie cellulaire Angiogenèse
Fibroses	Pulmonaire Rénale Hépatique
Autres pathologies	Ostéo-arthrite Diarrhée induite par le choléra Obésité

Tableau 5 : Rôles pathophysiologiques des signaux induits par le LPA [170].

6. LPA et os

Des études de RT-PCR ont montré que certaines cellules osseuses et cartilagineuses expriment les récepteurs du LPA avec une prépondérance pour LPA₁ [221,222,223]. Les ostéoblastes eux-mêmes sont capables de produire du LPA [224,225]. Au cours de l'embryogenèse chez la souris, ATX est d'abord exprimée dans le mésenchyme puis progressivement dans les os longs. Cette expression va diminuer pour se localiser en fin d'embryogenèse aux os du crâne, aux côtes, sternum et au niveau des futures zones articulaires des membres [199].

a. Cartilage articulation et chondrocytes

Le LPA serait un régulateur du cartilage. L'autotaxine est exprimée dans des lignées mésenchymateuses et dans le pré-cartilage au niveau des articulations [273,274]. La première démonstration de l'implication du LPA dans le système cartilagineux a été réalisée en 1998, où il a été montré que le LPA était capable d'induire une augmentation du calcium intracellulaire par les chondrocytes articulaires [226]. Par la suite, il a été montré que le LPA stimule la prolifération des chondrocytes primaires articulaires de rat par la voie G_i -ERK [227]. Le LPA agirait en potentialisant l'effet de la vitamine D3 sur les chondrocytes en augmentant la maturation et la survie cellulaire associée à la production de matrice [228]. Cependant le LPA joue aussi un rôle inhibiteur sur la prolifération d'une lignée de chondrocytes articulaires immortalisée [229]. Ces données suggèrent que les réponses au LPA des chondrocytes divergeraient selon la sous-catégorie cellulaire. Plus récemment il a été décrit un polymorphisme du récepteur LPA_1 associé à l'arthrose, une dégénérescence du cartilage suggérant que l'axe LPA- LPA_1 pourrait être associé à des pathologies cartilagineuses sur une population japonaise [230].

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie articulaire ayant pour point de départ l'inflammation de la synoviale, la membrane qui tapisse l'intérieur de la cavité articulaire et qui a pour fonction de sécréter le liquide articulaire qui lubrifie l'articulation. Une polyarthrite rhumatoïde peut conduire à la destruction du cartilage articulaire. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires intra-articulaires, principalement le $TNF-\alpha$, est à l'origine des synovites et des érosions articulaires [231]. L'activité métabolique des chondrocytes est accélérée lors de ce processus. Le LPA stimule la migration des synoviocytes et la production de cytokines inflammatoires [232]. L'axe ATX/LPA semble être impliqué dans ce processus. Les fibroblastes synoviaux de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde expriment des niveaux d'ARN messager d'ATX significativement plus élevés que les fibroblastes synoviaux non inflammatoires. L'autotaxine stimule la production de cytokines attractantes pour les neutrophiles par les synoviocytes [232]. Des taux élevés d'ATX au niveau des articulations atteintes chez les patients pourraient contribuer à la destruction articulaire.

b. Os et remodelage

Le LPA influence l'ostéogenèse par au moins deux récepteurs LPA_1 et LPA_4 . L'activation de LPA_1 induisant une augmentation des taux de Ca^{2+} intracellulaire agit positivement sur la différenciation

ostéogénique alors que l'activation de LPA₄ induisant l'augmentation du taux de l'AMPc agirait négativement [212].

- **LPA et ostéoblastes**

Dans les ostéoblastes primaires de rat, l'activation du récepteur aux nucléotides P2X7 stimule la production de LPA et la minéralisation [224,225]. Plusieurs catégories de cellules ostéoblastiques sont capables de répondre au LPA incluant les précurseurs ostéoblastiques MC3T3-E1 [233], la lignée d'ostéoblaste immature MG63 [234] ainsi que les ostéoblastes primaires [225]. Les réponses des ostéoblastes aux LPA sont nombreuses. Le LPA stimule la prolifération des ostéoblastes primaires de rat dépendant de la signalisation impliquant la protéine G_i et le calcium cytosolique et inhibe leur apoptose [222,235]. Le LPA est capable d'agir en synergie avec la vitamine D3 pour augmenter la maturation de la lignée d'ostéosarcome humaine MG63 [234,236]. Le LPA exerce aussi une action chimio attractante sur les ostéoblastes. La signalisation cellulaire induite par le récepteur LPA₁, dans les ostéoblastes stimule la synthèse d'ADN par un mécanisme dépendant des protéines G_i et régule le réarrangement du cytosquelette d'actine par une activation de la voie Rho/ROCK [222,224,237].

Plusieurs travaux ont montré l'implication des récepteurs du LPA dans les ostéoblastes. LPA₁ stimule la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes et pourrait donc avoir un effet positif sur la formation osseuse [212]. Néanmoins le LPA via LPA₁ induit la production d'IL-6 et d'IL-8 par les ostéoblastes, deux cytokines stimulant l'ostéoclastogénèse [238]. Donc, en raison de son activité à la fois sur les ostéoblastes et les ostéoclastes, le LPA pourrait être impliqué dans le contrôle du remodelage osseux de façon globale. Au niveau de la structure du squelette des animaux *LPA1*^{-/-}, les seuls phénotypes apparaissant sont des défauts craniaux-faciaux [205] et de la taille du sternum (observation personnelle). L'analyse plus en détail de ces animaux n'est pas publiée à l'heure actuelle. Au niveau de l'implication d'autres récepteurs du LPA dans l'os, il a été montré que LPA₄ inhibe la différenciation ostéoblastique. En accord avec son activité *in vitro*, la délétion de LPA₄ chez la souris conduit à une augmentation du volume osseux et du nombre de travées osseuses (figure 16) [212]. Des inhibiteurs de LPA₄ pourraient être intéressants dans le cadre du traitement de l'ostéoporose ou des maladies liées à la formation osseuse.

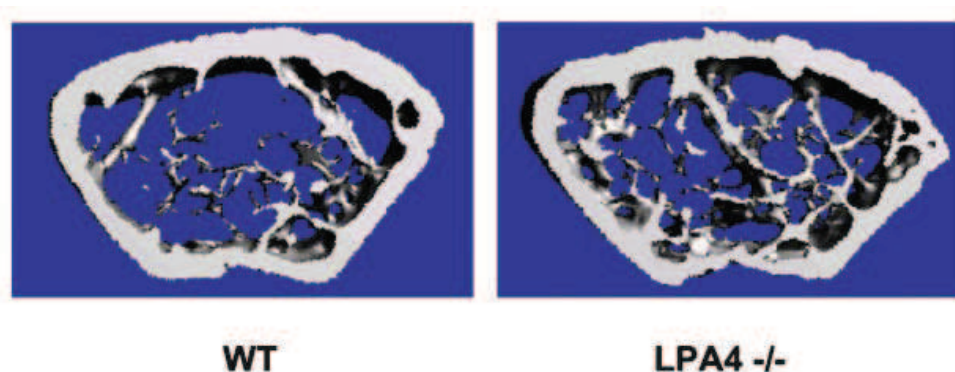


Figure 16 : Les souris invalidées pour LPA4 montrent une augmentation du volume osseux. Coupes de fémurs obtenues par scanning μ CT des souris LPA4^{-/-} et sauvages âgées de 20 semaines [212].

- **LPA et ostéoclastes**

L'effet direct du LPA sur les ostéoclastes est peu documenté à l'heure actuelle. Cependant, deux études récentes, postérieures au travail expérimental qui sera présenté par la suite, décrivent l'action du LPA sur les ostéoclastes matures. Les ostéoclastes murins matures expriment les ARN messagers de LPA_{1,2,4,5} mais pas LPA₃ [239].

Chez l'ostéoclaste mature, le LPA induit une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire, des changements morphologiques par remaniement des fibres d'actine et active NFATc1 qui est un facteur de survie des ostéoclastes (figure 17) [240]. L'inhibition de LPA₁, par le VPC-32183, bloque l'effet du LPA sur l'élévation calcique, sur la translocation de NFATc1 et donc les effets sur la survie, et ceci de façon spécifique des protéines G_i. Le VPC-32183 est un antagoniste non spécifique des récepteurs LPA₁ et LPA₃. Cette drogue n'a pas d'effet sur la rétraction des pseudopodes induite par l'activation de la voie G_{12/13}-Rho. Cette activité du LPA sur les ostéoclastes serait donc dépendante d'autres récepteurs [239].

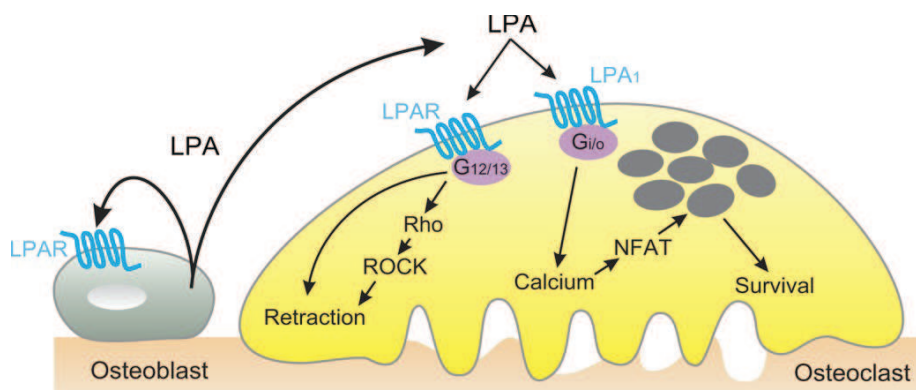


Figure 17 : Mécanismes d'action du LPA sur les ostéoclastes [239]

La seconde étude montre que le LPA, via un mécanisme vraisemblablement dépendant de LPA₂, augmente la fusion ostéoclastique, le périmètre de la zone de scellement et l'activité de résorption grâce à l'augmentation de la localisation intracellulaire de la TRIP6 (Thyroid hormone Receptor-interacting Protein 6) au niveau de la zone de scellement [241].

c. Métastases osseuses

Le LPA joue un rôle dans la mise en place des métastases osseuses issues de cancer du sein [4]. Notre laboratoire a montré que le LPA peut être produit au site même de la métastase des suites de l'interaction entre les cellules tumorales et les plaquettes sanguines. Le LPA favorise la progression de ces métastases en stimulant directement la croissance tumorale et indirectement la destruction osseuse en agissant sur la sécrétion des interleukines IL-6 et IL-8, par les cellules cancéreuses (figure 9) [4]. Dans ce modèle d'étude, bien que les cellules de cancers du sein utilisées (MDA-B02) expriment LPA₁, LPA₂ et LPA₃, la plupart des activités du LPA dans la prolifération et la sécrétion des cytokines pro-ostéoclastiques sont dépendantes de l'activation du récepteur LPA₁ [5].

La douleur est un des facteurs de morbidité essentiel chez les patientes atteintes de métastases osseuses. Le LPA via notamment son récepteur LPA₁ est impliqué dans les douleurs neuropathiques [242]. La douleur osseuse est d'une autre nature, sans doute liée à la formation d'un excès de protons lors de l'acidification des lacunes en cours de résorption. Ces protons rentrent en contact avec les fibres nerveuses sensibles innervant l'os [243]. Il a été montré que l'expression de LPA₁ dans les neurones DRG (fibres C) était très élevée chez les rats atteints d'ostéosarcome et que ces fibres étaient sensibilisées à l'action du LPA [244]. Ceci suggère que le LPA produit dans un contexte cancéreux ou de métastases pourrait contribuer à l'installation de la douleur chez les patients.

7. ATX/LPA et cancer

a. Effets cellulaires

Le développement d'une lésion tumorale implique le franchissement de barrières anatomiques, l'invasion du tissu normal adjacent, la migration à travers le réseau vasculaire pour coloniser des

organes à distance, mais aussi une néo vascularisation pour se développer au delà d'un certain volume.

- **Rôle dans la prolifération cellulaire**

Le LPA est un puissant agent mitogène agissant sur une grande variété de types cellulaires, normaux, transformés ou cancéreux. On sait depuis les années 90 que la nature de la chaîne carbonée du LPA influence de façon majeure sa capacité à induire la prolifération cellulaire avec une potentialité maximum pour le 1-oleoyl LPA [245]. L'ATX, elle-même, stimule la prolifération de différentes lignées cellulaires telles que les cellules de mélanome A.2058, de cancer du sein MDA-MB-231 et les cellules ovariennes de hamster CHO-K1 [116]. La capacité d'ATX à produire le LPA, grâce à son activité lysoPLD, explique son action sur la prolifération cellulaire [116].

Comme nous le verrons plus loin pour son action sur la migration cellulaire, le LPA stimule la prolifération cellulaire via plusieurs mécanismes impliquant diverses voies de signalisation. Bien avant l'identification des différents récepteurs du LPA, on savait que le LPA stimulait la prolifération cellulaire selon des voies dépendantes des protéines G sensibles à la toxine de pertussis (protéine Gi) [246]. Cette voie de signalisation amenant à l'activation des MAPK, Erk1/2 [247]. Cependant le rôle de l'activation d'Erk1/2 dans les effets mitogéniques du LPA n'est pas universel. Pour ne citer qu'un exemple, le LPA stimule la prolifération des cellules ostéoblastiques même en présence d'inhibiteur de la voie MEK/Erk. Dans ce cas, la voie dépendante de protéines Gq (PLC, Ca²⁺, PKC) semble être la plus importante [237]. Au cours de la dernière décennie, il est aussi apparu que les effets du LPA pouvaient être dépendants, dans certains types cellulaires, de la transactivation de récepteur de facteurs de croissance (EGF, FGF, PDGF) [246,248].

Des études sur la prolifération des cellules de cancer colorectal HCT116 et LS174T ont mis en évidence un lien entre la stimulation par le LPA, la translocation nucléaire de la β -caténine et l'activation de gènes cibles impliqués dans le processus prolifératif comme c-myc et la cycline D [249]. Une augmentation de l'expression de la cycline D a été observée également *in vivo* dans les tumeurs mammaires induites chez les souris transgéniques sur-exprimant ATX ou chacun des récepteurs du LPA sous contrôle du promoteur MMTV [250]. L'activation constitutive des voies dépendantes de la β -caténine joue un rôle important en carcinogenèse notamment dans le cancer colorectal. Un lien supplémentaire entre LPA et β -caténine a été montré récemment *in vivo* par l'analyse des souris *LPA2^{r/-}* [251]. En effet chez ces souris, il apparait une diminution de l'expression

de la β -caténine et une chute de sa localisation nucléaire visible sur des coupes de cellules épithéliales de côlon comparé aux souris sauvages [251]. Au niveau physiopathologique, les animaux *LPA2^{-/-}* présentent une résistance partielle à l'induction de tumeurs coliques expérimentales [251].

- **Rôle dans la mobilité cellulaire**

Une des premières conséquences de la transformation maligne des cellules est l'acquisition des propriétés migratoires et invasives [252]. Au début des années 90, des études menées sur les cellules de mélanomes A-2058, ont montré que l'autotaxine était un facteur stimulant la mobilité cellulaire [171]. Depuis, le nombre de lignées cellulaires répondant à l'activité motogène de l'ATX n'a cessé d'augmenter [190,253,254]. C'est en 2002 que l'activité stimulatrice de la mobilité cellulaire de l'ATX a été associée à son activité lysoPLD et à la présence de LPC [116,255].

Le LPA exerce de puissants effets sur la migration cellulaire (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules épithéliales, cellules cancéreuses), suggérant un rôle important dans la réparation tissulaire et l'invasion tumorale [256,257]. Les cellules répondent au LPA par deux mécanismes migratoires, la chimiokinésie c'est-à-dire le mouvement non directionnel en réponse à un stimulus et la chimiotaxie c'est-à-dire le mouvement dirigé des cellules en fonction d'un gradient de concentration d'une substance attractive [258,259,260]. Ceci confère un pouvoir pro-métastatique important au LPA qu'il soit produit au sein ou en dehors de la tumeur.

Le LPA engendre des changements rapides de la forme des cellules (contraction des cellules musculaires lisses, étalement des fibroblastes, rétraction des neurones) résultant de profonds remaniements du cytosquelette (formations de fibres de stress, réorientation des microtubules, formation de pseudopodes) [261]. Dans la plupart des lignées cellulaires cancéreuses ou non, la stimulation de la migration par le LPA passe par l'activation de LPA_1 [262]. L'activation de LPA_2 , à l'inverse, semble avoir un effet inhibiteur sur la migration cellulaire [263]. Cependant quelques lignées font exception, par exemple la migration des cellules ovariennes SCOV3 et HEY nécessite l'activation des récepteurs LPA_2 et LPA_3 [264]. Cela amène directement à se poser la question quant aux réactions cellulaires induites par le LPA dans des cellules qui expriment plusieurs récepteurs.

Le LPA augmente aussi l'adhésion cellulaire en favorisant l'interaction des protéines de la MEC avec les intégrines [265]. FAK est un élément central des complexes d'adhérence focale impliqués dans la signalisation cellulaire en réponse à l'attachement à la MEC via les intégrines. Au cours du

processus de migration et de l'adhésion cellulaire, la phosphorylation de FAK joue un rôle critique [266]. Le LPA induit une forte autophosphorylation de FAK par une voie de signalisation dépendante de $G_{12/13}$ -RhoA-ROCK [267]. En réponse au LPA, une forte redistribution de FAK au niveau de la membrane plasmique a été décrite dans les cellules de cancer ovarien SK-OV3. Dans ce cas l'inhibition de la voie de signalisation G_i – ras –MEKK bloque les effets du LPA sur la redistribution de FAK et sur la migration de ces cellules mais n'altère pas l'autophosphorylation de FAK [268]. Ceci rend compte du rôle du LPA en amont dans la signalisation dépendante de l'activation de FAK et certainement de deux voies de signalisation différentes.

- **Rôle dans l'invasion cellulaire**

Il est bien montré que la capacité des cellules à former des invadopodes est étroitement liée à leur capacité invasive et leur capacité métastatique [269]. A partir d'expériences d'invasion cellulaire menées *in vitro*, l'équipe de Nam a montré que l'ATX était un facteur chimioattractant pour les cellules NIH3T3 [270]. Récemment il a été montré que grâce à son activité lysoPLD, l'autotaxine participe à la production d'invadopodes via l'activation de LPA_4 , l'augmentation de l'AMPc et de l'action de Rac dans les cellules de fibrosarcome HT1080 [271].

Le passage des membranes (extravasation) par les cellules tumorales grâce aux processus d'invasion constitue une étape importante dans la cascade métastatique. L'expression d'enzymes protéolytiques tels que les MMPs permettent aux cellules tumorales de dégrader la membrane basale et d'envahir la matrice extracellulaire [272]. Le LPA stimule l'invasion cellulaire à travers l'activation de protéase comme les MMPs et uPA (urokinase-type Plasminogen Activator) [268,273,274].

MMP-7 est surexprimée dans un grand nombre de cellules cancéreuses [275]. Elle joue un rôle de régulateur de protéolyse important à la surface des cellules. Dans les cellules de cancer ovarien, le LPA est capable de réguler la sécrétion et l'activation de MMP-7 [276] et l'invasion cellulaire. L'inhibition de LPA_2 inhibe l'effet sur l'invasion de ces cellules [275]. Le LPA stimule la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme IL-8 et le VEGF par les cellules cancéreuses qui sont capables d'induire la sécrétion et l'expression de MMP-7 par action paracrine [277,278]. MMP-7 est capable d'activer la pro-MMP-2 et la pro-MMP9 deux autres MMPs importantes dans l'invasion cellulaire. Il a été montré que l'activation de la MMP-2 est également stimulée par le LPA [274,279]. Ainsi l'hypothèse proposée serait que les effets du LPA sur l'action des MMPs pourraient être stimulés par l'activation initiale de la MMP-7.

- **Rôle dans la survie cellulaire**

Aux doses physiologiques, le LPA protège de la mort cellulaire induite par la déprivation en facteurs de croissance ou par des agents utilisés en chimiothérapie [280,281]. *In vivo*, l'administration par voie orale de LPA chez les souris irradiées réduit de façon significative le nombre de corps apoptotiques dans la crypte digestive [281]. Ceci montre un effet positif du LPA sur la survie cellulaire, qui n'est donc pas limité aux seules cellules cancéreuses.

L'autotaxine semble avoir aussi un rôle anti-apoptotique via la production de LPA et l'activation de la voie de signalisation PI3K et AKT [282]. Le LPA relaie aussi le signal anti-apoptotique par une inhibition du suppresseur de tumeur P53. P53 est inactivé dans environ 50% des cancers [283]. L'équipe de Murph a démontré que l'activation cellulaire par le LPA conduit à la réduction de l'activité transcriptionnelle de p53 et à une diminution de sa présence dans le noyau des cellules de carcinome pulmonaire A549 [284].

- **Rôle dans l'angiogenèse**

La littérature présente une accumulation de travaux montrant que l'axe ATX/LPA contrôle le processus physiologique de vascularisation et pathologique d'angiogenèse tumorale. L'autotaxine est essentielle au développement vasculaire de souris. Les souris invalidées pour l'autotaxine meurent à l'état embryonnaire J10.5 à cause d'un défaut de la formation vasculaire [125,191]. Ceci s'explique par le fait que l'ATX stimule la prolifération des cellules endothéliales et la mobilité des cellules musculaires lisses de l'artère coronaire. Au niveau pathologique et plus particulièrement dans le cadre du développement des cancers, la surexpression d'ATX dans les cellules NIH 3T3 transformées par l'oncogène ras augmente l'angiogenèse et la dissémination métastatique des cellules injectées à des souris *nude* [270,285]. Dans un modèle d'angiogenèse expérimentale sous-cutanée chez la souris à l'aide de matrigel, l'autotaxine a un effet comparable à celui du VEGF [285].

Par lui-même, le LPA stimule la migration et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* [286,287]. De plus, en augmentant la production de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, le MIF (macrophage migration inhibitory factor), et l'IL8, le LPA favoriserait indirectement le processus d'angiogenèse [278,288,289]. Récemment il a été proposé que le LPA stimule l'expression du VEGF-A à travers l'activation de HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1) [290]. Cependant, les travaux du laboratoire ont montré que sur une série de lignées de cancer du sein, *in vitro*, le LPA n'induisait pas l'expression de VEGF-A [291]. Ceci montre que la stimulation du VEGF-A par le LPA est complexe et

liée au contexte cellulaire. Il apparaît que la formation d'une boucle d'amplification entre ATX, LPA et VEGF serait particulièrement déterminante dans le processus d'angiogenèse tumorale [292].

b. Cancers

- **LPA**

Le premier soupçon d'une implication possible du LPA dans le cancer remonte à 1991 quand le LPA fut détecté dans des biopsies de tumeurs de côlon alors qu'il était absent dans des biopsies de côlons sains [293]. Quelques années plus tard, le même groupe a observé qu'il existait une corrélation entre la quantité de LPA présente dans des biopsies de cancers de l'œsophage et leur degré de malignité [294]. Des taux sériques de LPA importants ont aussi été retrouvés chez des patients atteints de myélome multiple [295].

Le lien le plus parlant entre LPA et progression tumorale est présenté dans le cas du cancer ovarien [264]. Les liquides d'ascite de ces patientes contiennent de fortes concentrations de LPA (1 à 80µM) [63]. Les concentrations plasmatiques de LPA détectées chez ces patientes seraient d'environ 10 fois supérieures à celles des patientes saines [296]. Le LPA des ascites pourrait provenir, au moins en partie des cellules cancéreuses, puisque certaines lignées cancéreuses d'origine ovarienne produisent du LPA *in vitro* dans leur milieu de culture [134]. Les cellules de cancers ovariens n'expriment pas fortement l'ATX. Mais, les tumeurs ovariennes sont en générale très volumineuses, donc par un effet de masse ATX [297] et la PLA1/2 [264] exprimées par ces cellules pourraient être à l'origine des hauts niveaux de LPA retrouvés dans le liquide d'ascite [63] qui par diffusion pourraient se retrouver dans le plasma. Ainsi, le LPA produit par les tumeurs ovariennes constitue sans doute un système de stimulation autocrin nécessaire à la progression tumorale. Des travaux récents ont montré que les effets du LPA dans le cancer ovarien seraient dépendants de LPA₂ [275,298,299]. L'utilisation de la mesure des taux circulants de LPA comme marqueur de la progression a été proposée dans le cadre des cancers gynécologiques [300]. Cependant, de telles variations de concentrations de LPA n'ont pas pu être observées dans d'autres types de cancers. Donc, il apparaît que l'altération des niveaux plasmatiques de LPA comme marqueur diagnostique et/ou pronostique n'est pas exploitable en clinique.

- **Rôle oncogénique de l'axe ATX/LPA/récepteurs**

Des études récentes ont montré que les récepteurs du LPA, incluant LPA₁, contrôlent directement la carcinogenèse. En utilisant un système d'expression inductible de ErbB2/HER2 dans une lignée cellulaire du sein humaine non tumorale, les MCF-10A, l'équipe de Witt a montré que LPA₁ possède une activité oncogénique [301]. Cependant dans ce modèle, un faible signal d'ErbB2/HER2 est nécessaire pour l'induction de signaux cellulaires activés par LPA₁. Une autre étude a montré que l'étape de transformation initiale des fibroblastes embryonnaires de souris avec c-myc et Tbx2 est aussi nécessaire pour les activités oncogéniques de LPA₁, LPA₂ et LPA₄ [302]. De plus, *in vivo*, la surexpression de LPA₁, LPA₂ et LPA₃ sous contrôle d'un promoteur MMTV dans des animaux transgéniques conduit à la formation de tumeurs mammaires spontanées. De façon intéressante, la surexpression d'ATX, chez ce même type d'animaux transgéniques (MMTV) conduit à la formation spontanée de cancers du sein [250]. Ces travaux suggèrent que c'est la sensibilisation des cellules épithéliales mammaires au LPA, induite par une augmentation locale de la formation de LPA ou par l'augmentation de la quantité de récepteurs du LPA à la surface des cellules qui serait l'initiateur de la carcinogenèse mammaire plutôt que l'activité spécifique d'un des sous-types de récepteur du LPA.

- **ATX**

L'ensemble des données décrites dans les chapitres précédents montre une concordance remarquable entre l'activité du LPA et celle de l'ATX. D'une manière similaire à l'émergence du rôle du LPA dans le développement des cancers, il apparaît de plus en plus d'éléments en faveur d'un rôle important de l'ATX en cancérologie. La première démonstration du rôle d'ATX dans le processus métastatique est que la combinaison de l'expression d'ATX et la transformation par Ras dans les fibroblastes augmente leur tumorigénicité et leur potentiel métastatique [270]. L'autotaxine est surexprimée dans plusieurs cancers humains incluant le sein [253], le rein [303], les poumons [304], la thyroïde [254] ainsi que dans les carcinomes hépatiques [305] et le lymphome d'hodgkin [63]. Une forte expression d'ATX est détectée dans les glioblastomes malins avec un haut taux d'infiltration [306]. Dans le cas du neuroblastome, les auteurs ont observé chez des patients atteints d'une forme très agressive de neuroblastome en stade clinique IV avec de multiples métastases que le niveau d'expression d'ATX était particulièrement élevé [190]. Dans le cancer de la prostate, une forte expression du niveau d'ATX est associée avec à la fois le potentiel malin et le mauvais pronostic [307]. L'autotaxine semble être aussi impliquée dans les carcinomes hépatocellulaires dus à une

fibrose hépatique [308] et le cancer colorectal [309]. Des niveaux importants d'ATX dans le fluide péritonéal ou au niveau de la tumeur, ont été liés au mauvais pronostic des patients atteints de cancer ovarien et de la thyroïde [254,297].

- **LPA₁**

Plusieurs études supportent l'idée qu'une expression aberrante de LPA₁ contribue à la capacité métastatique des cellules de cancers du sein contrairement aux cancers ovariens où LPA₁ agirait comme un régulateur négatif dans la progression tumorale [250,310]. Les conséquences de l'expression des récepteurs du LPA dépendent donc du type de cellules et du type de tumeur. A l'état physiologique, LPA₁ est exprimé de façon assez ubiquitaire. De ce fait on le retrouve également dans différentes tumeurs humaines incluant le poumon, le sein, l'estomac, le rein et la prostate [311].

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* indiquent une relation entre le récepteur LPA₁, la mobilité et les métastases de cancer du sein [312]. De plus, notre laboratoire a montré que la surexpression de LPA₁ dans les cellules de cancer du sein augmente leur capacité à métastaser à l'os [4,5]. Un argument supplémentaire entre expression de LPA₁ et métastases issues de cancer du sein provient d'études sur le gène suppresseur de métastases Nm23-H1. Nm23-H1 régule négativement LPA₁ et la réintroduction de LPA₁, par transfection, dans les cellules de cancer du sein exprimant Nm23-H1 est suffisante pour retrouver les propriétés invasives et métastatiques de ces cellules [313,314]. Cette partie sera plus détaillée dans la partie expérimentale 2.

Dans le cadre d'autres cancers, notamment dans le cancer de la prostate, LPA₁ semble jouer un rôle de premier plan. LPA₁ stimule, *in vitro*, la migration des cellules prostatiques. LPA₁ semble contrôler la translocation nucléaire de l'AR (Androgen Receptor) rendant compte d'une stimulation du cycle cellulaire et de la prolifération cellulaire [315]. De plus, l'expression forcée de LPA₁ dans les cellules LnCap, lignée cellulaire androgéno-dépendante, permet d'une part de rendre ces cellules (LnCap-LPA1) sensibles à l'action mitogène du LPA et d'autre part de permettre à ces cellules de proliférer en absence de testostérone, *in vitro*, et de générer à elles-seules des tumeurs sous-cutanées chez la souris [315]. Ceci suggère que LPA₁ puisse jouer un rôle important au cours du développement des cancers de la prostate et plus particulièrement au moment de la phase d'échappement de ces cancers à la privation androgénique. Cette phase étant une étape clé de la progression des cancers prostatiques vers une phase métastatique.

Il est possible que l'expression élevée de LPA₁ puisse impacter différemment sur les cancers hormonaux-dépendant par rapport aux autres types de cancers. En effet, comme nous l'avons indiqué précédemment la progression des cancers ovariens est corrélée avec un faible niveau d'expression de LPA₁ [312]. Ceci est retrouvé également dans le cas des cancers colorectaux [316]. Comme il est discuté plus en détail dans le travail expérimental 2, les œstrogènes sont capables de réguler négativement l'expression de LPA₁ [317]. L'évolution de cancers du sein vers un profil d'indépendance aux œstrogènes peut potentiellement rendre compte d'une sensibilité accrue de ces cancers à l'action du LPA via LPA₁. Ceci est une hypothèse qui demande bien sûr à être confirmée par des études ciblées.

Il est intéressant de noter que des mutations du récepteur LPA₁ peuvent être induites chez le rat dans un modèle de carcinome hépatique. Ces mutations portent principalement au niveau du septième passage transmembranaire amenant des altérations des acides animés hydrophobiques en hydrophyliques. Cependant les fonctions physiologiques de ces mutations ne sont pas claires. Il serait intéressant de déterminer si ces mutations entraînent des différences d'affinité pour le LPA ou dans les voies de signalisation induites par rapport à un récepteur LPA₁ sauvage [318].

- **LPA₂**

De nombreuses études basées sur des expériences de RT-PCR quantitatives ont montré une tendance à une élévation du niveau d'expression de LPA₂ dans les cancers de la thyroïde, du côlon et du sein [63]. Il a aussi été montré que les niveaux d'expression des récepteurs LPA₂ et LPA₃ étaient plus élevés dans les tumeurs des patientes à des stades avancés de développement tumoral que dans des formes bénignes ou au niveau de l'épithélium ovarien normal [310]. Le rôle important de LPA₂ semble s'étendre de façon plus large que LPA₁ au développement d'autres cancers. En effet au delà des expériences menées *in vitro* et des études de transcriptomique, il a été montré que les souris invalidées pour l'expression de LPA₂ sont résistantes à l'induction de cancer du côlon [251].

- **LPA₃**

LPA₃ est exprimé de façon moins importante dans le cancer du sein et son expression ne semble pas être modifiée chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatique [258,319]. Cependant, comme indiqué précédemment, la surexpression de LPA₃ dans la glande mammaire de souris

conduit aussi au développement spontané de tumeurs métastatiques [250]. Dans le cadre du cancer de la prostate, une étude clinique récente a permis de mettre en évidence le rôle important de LPA₃. Les niveaux de LPA₃ sont plus hauts dans les tumeurs prostatiques que dans le tissu sain [320]. De plus il a été montré que le niveau d'expression de LPA₃ est particulièrement élevé dans les lignées de cellules prostatiques humaines PC3, LNCaP et DU145 [321]. Il est intéressant de noter que, non seulement le LPA a un effet mitogène sur les cellules androgéno-insensibles PC3 et DU145, mais qu'en plus il stimule sa propre sécrétion par ces cellules. Cette observation confère au LPA une activité autocrine qui permet d'entrevoir une boucle d'amplification de la croissance tumorale dépendante du LPA, au niveau des tumeurs prostatiques [63].

- **Cibles thérapeutiques (inhibiteurs)**

Un certain nombre d'inhibiteurs de la voie ATX/LPA a été développé au cours de la dernière décennie. On distingue deux grandes classes : les inhibiteurs structuraux et non structuraux. La difficulté que l'on rencontre avec ces inhibiteurs est leur non spécificité. Une liste non exhaustive de ces inhibiteurs a été décrite dans plusieurs revues récentes [166,170,322].

PARTIE III : TRAVAIL EXPERIMENTAL

A. Objectifs des travaux de recherche

La dissémination métastatique est la principale cause de mortalité des patients atteints de cancers. Les données les plus récentes présentées par le Dr. R. Coleman au dernier congrès CIBD (Sheffield, septembre 2010) indiquent que la médiane de survie des patients atteints de métastases osseuses et recevant les meilleures thérapies disponibles à ce jour n'est que de 24 mois [323]. Il est à noter que cette valeur de survie est similaire à celle de patients ne recevant pas de traitement. Malgré une efficacité décevante sur le plan de la survie, l'intérêt des traitements est bien réel grâce à leur action préventive sur l'apparition des événements osseux et à leur bénéfice sur la morbidité des patients. Il est clair cependant que dans ce contexte, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques revêt un caractère crucial.

Récemment notre laboratoire a mis en évidence que le LPA, produit par les plaquettes sanguines activées lors de leurs interactions avec les cellules tumorales, était un facteur majeur de la progression des métastases osseuses (figure 9)[4]. Dans ce contexte, la poursuite des travaux a montré que le ciblage génétique ou pharmacologique du récepteur de type 1 du LPA (LPA₁) bloquait la croissance tumorale et la progression des métastases osseuses dans un modèle animal, indiquant que les voies de signalisation dépendantes de l'axe LPA/LPA₁ sont des cibles d'avenir extrêmement encourageantes dans le traitement des métastases osseuses [5].

Dans la continuité de ces travaux, un certain nombre de questions peuvent être soulevées. 1) Comment le LPA est-il produit au site tumoral (primaire ou métastatique) ? 2) Est-ce que le LPA contrôle la phase précoce du processus métastatique des cancers du sein ? 3) Est-ce que le récepteur de type 1 (LPA₁) est un facteur prédictif et/ou une cible thérapeutique dans le cas des cancers du sein métastatiques ? 4) Dans le cas particulier des métastases osseuses, est-ce qu'au-delà de son action sur les cellules tumorales, le LPA agit sur les cellules de l'environnement osseux ?

En résumé, l'objectif de cette thèse a été de définir tant sur le plan clinique que mécanistique le rôle de l'autotaxine, du LPA et de son récepteur LPA₁ dans la progression métastatique des cancers du sein en portant une attention particulière sur les métastases osseuses.

B. Travail expérimental n°1 : l'expression de l'autotaxine par les cellules cancéreuses contrôle la formation des métastases osseuses chez la souris suite à l'activation des ostéoclastes par l'acide lysophosphatidique

1. Introduction

Les plaquettes sanguines produisent de fortes quantités de LPC sous forme soluble ou associée à des microvésicules qui, sous l'action de l'activité LysoPLD de l'autotaxine, constituent une source majeure de LPA *in vivo* [127]. Il a été montré que l'augmentation de l'expression de l'autotaxine est corrélée avec une augmentation du caractère invasif des cellules de cancer du sein [116]. Dans une étude très récente, le groupe de Gordon Mills a montré que les souris transgéniques MMTV-atx surexprimant ATX dans la glande mammaire développent des tumeurs mammaires spontanées. Ceci indique qu'ATX possède une activité pro-oncogénique [250]. En continuité avec les travaux de notre laboratoire, mon étude a consisté (i) à comprendre le rôle d'ATX dans le contexte de la croissance et de la dissémination métastatique des cancers du sein (ii) à déterminer si l'autotaxine est un facteur pronostique de la dissémination métastatique des cancers du sein et (iii) à déterminer si l'autotaxine est une cible potentielle dans le traitement des cancers du sein ou dans la prévention des métastases.

Dans ce but, nous avons généré une série de nouvelles lignées cellulaires humaines ou murines de cancers du sein. L'objectif étant de disposer de cellules pour lesquelles l'expression d'ATX était soit induite de novo, soit inhibée. Pour cela nous avons utilisé les cellules humaines de carcinome mammaire MDA-B02 qui est un sous-clone des cellules MDA-MB-231 ayant un fort tropisme osseux et qui n'expriment pas ATX à l'état basal. Le travail a consisté à induire l'expression de novo d'ATX dans cette lignée cellulaire. Puis nous avons utilisé la lignée cellulaire murine 4T1 qui exprime naturellement ATX et qui possède la propriété d'induire, à partir d'une tumeur primaire, la formation spontanée de métastases au foie, aux poumons et à l'os, chez la souris immunocompétente syngénique BALB/C. Dans ce cas, nous avons induit l'expression stable d'ARN interférents (shRNAi) afin de bloquer l'expression d'ATX dans ces cellules.

2. Principales observations

In vivo, l'injection intraveineuse des cellules tumorales MDA-B02/ATX à des souris immunodéficientes BALB/C *nude* stimule la formation des métastases osseuses à en juger par l'augmentation de la résorption osseuse, de la masse tumorale dans la cavité médullaire et du nombre d'ostéoclastes actifs au site des métastases osseuses. De façon complémentaire, nous avons observé que la formation des métastases osseuses chez des souris immunocompétentes BALB/C induite par l'injection intracardiaque des cellules 4T1-shATX, que le nombre d'ostéoclastes actifs au site des métastases osseuses était très fortement inhibé par rapport aux animaux injectés avec les cellules contrôles. De plus, nous avons constaté une baisse significative comprise entre 80% et 85% du nombre de métastases pulmonaires chez les souris injectées avec les cellules 4T1-shATX par rapport aux cellules contrôles parentales. Ces résultats indiquent que l'absence d'ATX altère la capacité métastatique des cellules 4T1-shATX. L'ensemble des résultats démontre pour la première fois que l'autotaxine contrôle le processus de dissémination métastatique spontanée des cellules de cancer du sein et suggère que l'autotaxine est une cible thérapeutique potentielle dans la prévention des métastases chez les patientes atteintes de cancer du sein. Ce résultat supporte l'hypothèse du rôle d'ATX dans la production de LPA dans l'environnement tumoral et son implication dans la progression des métastases osseuses de cellules de cancers du sein [4].

On sait qu'au cours du développement des métastases osseuses, les ostéoclastes jouent un rôle prépondérant car ce sont les seules cellules capables de dégrader le tissu osseux. Notre laboratoire a montré que le LPA contrôle l'activité des ostéoclastes indirectement via l'activation des cellules tumorales et la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance pro-ostéoclastiques. Mon projet a également permis de montrer le rôle direct du LPA sur la différenciation ostéoclastique. En plus du recrutement accru des ostéoclastes dans les pattes des animaux métastatiques en raison de la hausse d'expression d'autotaxine, nous avons démontré qu'*in vitro*, la présence d'ATX soit recombinante, soit présente dans des milieux de culture conditionnés des cellules MDA-B02/ATX stimulait la différenciation ostéoclastique. De plus, l'addition de LPA dans du sérum préalablement déplété de sa fraction lipidique par épuisement sur du charbon actif, restaure la capacité du sérum à supporter l'ostéoclastogenèse en présence de RANK-L et de M-CSF.

Dans cette étude nous avons montré que l'autotaxine contrôle la progression des métastases osseuses issues de cellules cancéreuses mammaires. Ce travail a démontré aussi un nouveau rôle du LPA en tant que facteur direct de différenciation ostéoclastique.

Cancer Cell Expression of Autotaxin Controls Bone Metastasis Formation in Mouse through Lysophosphatidic Acid-Dependent Activation of Osteoclasts

Marion David^{1,2,3}, Estelle Wannecq⁴, Françoise Descotes⁵, Silvia Jansen⁶, Blandine Deux^{1,2,3}, Johnny Ribeiro^{1,2,3}, Claire-Marie Serre^{1,2,3}, Sandra Grès⁴, Nathalie Bendriss-Vermare^{7,8}, Mathieu Bollen⁶, Simone Saez⁵, Junken Aoki⁹, Jean-Sébastien Saulnier-Blache⁴, Philippe Clézardin^{1,2,3}, Olivier Peyruchaud^{1,2,3*}

1 INSERM, U664, Lyon, France, **2** Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France, **3** Faculté de Médecine Laennec, Lyon, France, **4** INSERM, U858, Toulouse, France, **5** Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France, **6** Laboratory of Biosignaling and Therapeutics, Department of Molecular Cell Biology, University of Leuven, Leuven, Belgium, **7** INSERM, U590, Lyon, France, **8** Centre Léon Bérard, Lyon, France, **9** Tohoku University, Sendai, Japan

Abstract

Background: Bone metastases are highly frequent complications of breast cancers. Current bone metastasis treatments using powerful anti-resorptive agents are only palliative indicating that factors independent of bone resorption control bone metastasis progression. Autotaxin (ATX/NPP2) is a secreted protein with both oncogenic and pro-metastatic properties. Through its lysophospholipase D (lysoPLD) activity, ATX controls the level of lysophosphatidic acid (LPA) in the blood. Platelet-derived LPA promotes the progression of osteolytic bone metastases of breast cancer cells. We asked whether ATX was involved in the bone metastasis process. We characterized the role of ATX in osteolytic bone metastasis formation by using genetically modified breast cancer cells exploited on different osteolytic bone metastasis mouse models.

Methodology/Principal Findings: Intravenous injection of human breast cancer MDA-MB-231 cells with forced expression of ATX (MDA-MB-231/ATX) to immunodeficiency BALB/C nude mice enhanced osteolytic bone metastasis formation, as judged by increased bone loss, tumor burden, and a higher number of active osteoclasts at the metastatic site. Mouse breast cancer 4T1 cells induced the formation of osteolytic bone metastases after intracardiac injection in immunocompetent BALB/C mice. These cells expressed active ATX and silencing ATX expression inhibited the extent of osteolytic bone lesions and decreased the number of active osteoclasts at the bone metastatic site. *In vitro*, osteoclast differentiation was enhanced in presence of MDA-MB-231/ATX cell conditioned media or recombinant autotaxin that was blocked by the autotaxin inhibitor vpc8a202. *In vitro*, addition of LPA to active charcoal-treated serum restored the capacity of the serum to support RANKL/M-CSF-induced osteoclastogenesis.

Conclusion/Significance: Expression of autotaxin by cancer cells controls osteolytic bone metastasis formation. This work demonstrates a new role for LPA as a factor that stimulates directly cancer growth and metastasis, and osteoclast differentiation. Therefore, targeting the autotaxin/LPA track emerges as a potential new therapeutic approach to improve the outcome of patients with bone metastases.

Citation: David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, et al. (2010) Cancer Cell Expression of Autotaxin Controls Bone Metastasis Formation in Mouse through Lysophosphatidic Acid-Dependent Activation of Osteoclasts. PLoS ONE 5(3): e9741. doi:10.1371/journal.pone.0009741

Editor: Erik H. J. Danen, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research, Leiden University, Netherlands

Received: January 14, 2010; **Accepted:** February 26, 2010; **Published:** March 17, 2010

Copyright: © 2010 David et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from the INSERM (O.P. and P.C.), the Comité départemental de la Loire de la Ligue Nationale contre le Cancer (O.P.), the French National Institute of Cancer, INCA (O.P., contract 0610-3D1616-102/PL 2006) and the French Association pour la Recherche sur le Cancer, ARC (O.P.). M.D. was a recipient of fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer. J.S. holds a postdoctoral fellowship of the Research Foundation - Flanders (FWO). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Olivier.peyruchaud@inserm.fr

Introduction

Bone is a common metastatic site for many cancers [1]. Bone metastases are associated with hypocalcaemia due to bone destruction, intractable bone pain and pathological fractures. Tumor cells present at the bone metastatic site stimulate osteoclast-mediated bone resorption, and bone-derived growth factors released from resorbed bone promote tumor growth, leading to the development of a vicious cycle. [2]. Unfortunately,

current treatments using powerful anti-resorptive agents (bisphosphonates) fail to provide life-prolonging benefit to patients with bone metastases raising the need for a better knowledge of the molecular mechanisms involved in this pathology [3]. We have recently found that lysophosphatidic acid (LPA) derived from blood platelets acts locally on tumor cells to promote the progression of bone metastases [4]. Among the cell surface specific receptors for LPA (LPA₁₋₆) expressed by tumor cells, we demonstrated that LPA₁ activity prevailed during bone metastasis

progression and that targeting this receptor was a new therapeutic strategy against bone metastases [5]. However, how LPA is generated at the tumor site and how LPA produced by tumor cells themselves might contribute to the progression of bone metastases are still unknown.

Autotaxin (ATX, NPP2) belongs to the nucleotide pyrophosphate phosphodiesterase (NPP) family [6]. In addition to the conserved phosphodiesterase (PDE) activity among all NPPs, autotaxin has a unique lysophospholipase D (lysoPLD) activity, allowing the generation of LPA from lysophosphatidylcholine (LPC) [7]. The biological significance of PDE and lysoPLD activities in autotaxin functions remains to be determined. However, the functional relevance of the catalytic activity of autotaxin *in vivo* was recently demonstrated from knockout mice studies showing that autotaxin is responsible for the levels of LPA in the blood circulation [8,9]. A link between increased lysoPLD activity and the formation of LPA was found in various pathologies such as rheumatoid arthritis [10], neuropathic pain [11], chronic hepatitis C [12] and adipocyte insulin-resistance in obesity [13]. Autotaxin is a glycoprotein initially identified as an autocrine motility factor secreted by human melanoma cells [14,15]. Increased expression of autotaxin was shown to correlate with increased invasiveness of breast cancer cells [16] and was found to enhance the metastatic potential of ras-transformed 3T3 fibroblasts [17]. Expression of autotaxin mRNA was detected at a basal level in almost all human tissues [18]. Intriguingly, upregulation of autotaxin gene was reported in a large variety of cancers such as glioblastoma [19], aggressive neuroblastoma [20], non small cell lung cancer [21], uveal melanoma associated with poor prognosis [22], thyroid carcinoma [23], hepatocellular carcinoma with metastases [24], and breast cancer [16]. MMTV-*ax* transgenic mice with specifically increased expression of autotaxin in the mammary gland showed an increased incidence of spontaneous mammary tumors over a two-year period, illustrating the pro-oncogenic function of autotaxin [25].

Here, we provide experimental evidence that breast cancer cells expressing autotaxin have a selective advantage to induce the formation of osteolytic bone metastases as a result of a novel pro-osteoclastic function of autotaxin-derived product LPA. These results illustrate the role of autotaxin in advanced breast cancers and suggest that targeting the autotaxin/LPA track might provide additional benefit for patients suffering from bone metastases.

Results

De novo autotaxin expression increases proliferation and invasion of human MDA-B02 breast cancer cells *in vitro*

We have shown previously that MDA-B02 cells do not express autotaxin at steady state [4]. To assess whether or not autotaxin plays a role in the metastasis dissemination of breast tumor cells, we introduced the cDNA of rat autotaxin into MDA-B02 cells. We used the tet-Off-regulated expression system in which autotaxin expression along with the luciferase is achieved specifically in the absence of the repressor, doxycycline [4]. As a unique member of the NPP family, autotaxin exhibits both lysoPLD and phosphodiesterase activities [26,27]. Therefore, as a control cell line we transfected MDA-B02 cells with an expression vector coding for mouse NPP1, which acts as a nucleotide phosphodiesterase but that lacks for the lysoPLD activity.

For each construct, we selected two stable clones: MDA-B02-ATX clone no. 30 and no. 38, and MDA-B02-NPP1 clones no. 10.5 and no. 42. The expression of autotaxin as a secreted protein and NPP1 as a membrane-bound protein were confirmed by western blotting using specific antibodies (Figure 1A). Clone

selections were based on high luciferase expression in absence of doxycycline (Figure 1B). As expected, we observed that in the absence of doxycycline only MDA-B02-ATX clones acquired a lysoPLD activity (Figure 1B), whereas both MDA-B02-ATX and MDA-B02-NPP1 clones had an increased PDE activity, as compared to parental cells (Figure 1B).

We have shown previously that the treatment with LPA increases the proliferation of MDA-B02 cells [4]. Here, we observed that, in the absence of doxycycline, LPC had a mitogenic activity by itself on both the parental MDA-B02 cells and transfected clones (Figure 1C). This findings might reflect the expression LPC receptors (GPR4, TDAG8) in MDA-B02 cells as well as in breast tumors [28]. However, LPC-dependent proliferation was further increased in MDA-B02-ATX cells, but not in MDA-B02-NPP1 cells or parental cells. Moreover, the treatment of cells with Ki16425, an antagonist of LPA₁ and LPA₃ receptors, totally blocked autotaxin-dependent but not LPC-dependent cell proliferation (Figure 1C). This indicated that recombinant ATX expressed by MDA-B02-ATX cells produced active LPA that stimulated cell proliferation through a LPA₁ receptor-dependent pathway.

Autotaxin has been implicated in the invasiveness of ras-transformed fibroblasts and breast cancer cells [16,17]. We observed that, in absence of doxycycline, MDA-B02-ATX clones had a significantly higher capacity to invade Matrigel™ in response to FBS than in the presence of doxycycline (Figure 1D). The gain of invasiveness of MDA-B02-ATX clones was also observed when compared to parental cells and MDA-B02-NPP1 clones, placed either in absence or presence of doxycycline. These results confirmed that autotaxin increased the invasive potential of breast cancer cells by a mechanism that required its lysoPLD activity.

De novo autotaxin expression enhances *in vivo* MDA-B02 bone metastasis formation

We have previously demonstrated that LPA derived from platelets supports the progression of bone metastases mediated by MDA-B02 cells in mice [4]. We hypothesized that elevated tumor cell-derived lysoPLD activity might also promote bone metastasis. Thirty two days after the intravenous inoculation of tumor cells into *nude* mice, radiographic analyses revealed that animals bearing MDA-B02-ATX clones exhibited a 40% to 70% increase in the extent of osteolytic lesions, as compared to that seen with MDA-B02-NPP1 clones and parental cells (Figure 2A). Histological examinations and histomorphometric analyses confirmed the radiographic observations and showed that *de novo* expression of autotaxin by breast cancer cells resulted in a reduction of bone volume (BV/TV) and increased skeletal tumor burden (Figure 2A). We observed no difference on legs of metastatic animals bearing MDA-B02-NPP1 clones compared to MDA-B02 parental cells at the histological level (Figure 2B). We have previously shown that LPA stimulates the potency of tumor cells to increase the recruitment of osteoclasts at the bone metastatic site [4]. Here, we observed that the surface of active osteoclasts per trabecular bone area located at the bone/tumor cell interface was increased in animals bearing MDA-B02-ATX clones, as compared to that observed in mice bearing parental or NPP1-expressing tumor cells (Figure 3).

Altogether, our results indicated that increased expression of autotaxin by MDA-B02 cells enhanced the formation of osteolytic bone metastases.

Downregulation of autotaxin expression inhibits invasion but not proliferation of mouse 4T1 breast cancer cells

To address the role of autotaxin in bone metastasis formation in an immunocompetent context, we exploited the 4T1 cell line that

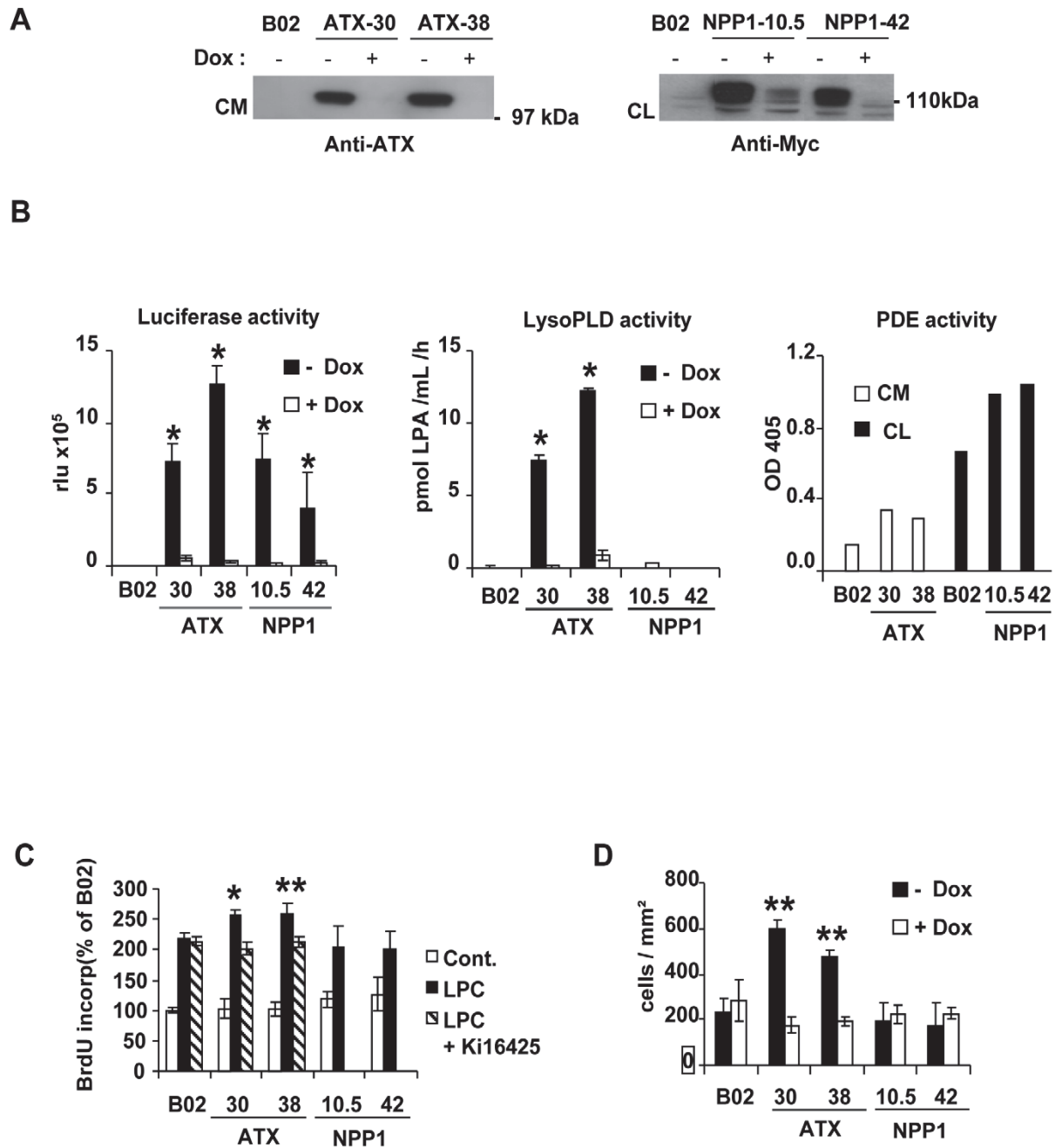


Figure 1. Characterization of forced expression of autotaxin in human breast cancer MDA-B02 cells. (A) Cells transfected with bidirectional expression vectors pBil-ATX or pBil-NPP1 were plated with (+) or without (-) doxycycline (Dox). Proteins from conditioned media (CM) or lysates of tumor cells (CL) of two stable clones (no. 30 and no. 38 to ATX, no. 10.5 and no. 42 to NPP1) were electrophoresed then immunoblotted with an anti-ATX antibody (Left panel) or anti-Myc antibody (Right panel). (B) Quantifications of luciferase activity (Left panel), lysoPLD activity (Middle panel) and PDE activity (Right panel) in each clone and parental MDA-B02 cells. (C) Cell proliferation was stimulated with LPC (10 μ M) in absence or presence Ki16425 (10 μ M). Results are expressed as the % of BrdU incorporation compared to unstimulated MDA-B02 parental cells. Data correspond to the mean $\pm$ SD of 6 replicates and are representative of at least 3 independent experiments. (D) Cell invasion was stimulated with 10% FBS used as chemoattractant. Results are the mean $\pm$ SD of cells of 3 replicates and are representative of at least 3 independent experiments. Data are expressed as the number of cells/mm². *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0009741.g001

is derived from a single mouse mammary tumor and recapitulates the distinct steps of metastasis when engrafted into the mammary gland of syngenic female BALB/C mice [29]. Firstly, we found that 4T1 cells expressed the mRNA of all forms of LPA receptors

and responded to LPA stimulation (Figure 4A and 4B). Additionally, we found that 4T1 cells expressed the autotaxin transcript and protein (Figure 4A and 4C), accounting for the secretion of an enzymatically active autotaxin protein (Figure 4C).

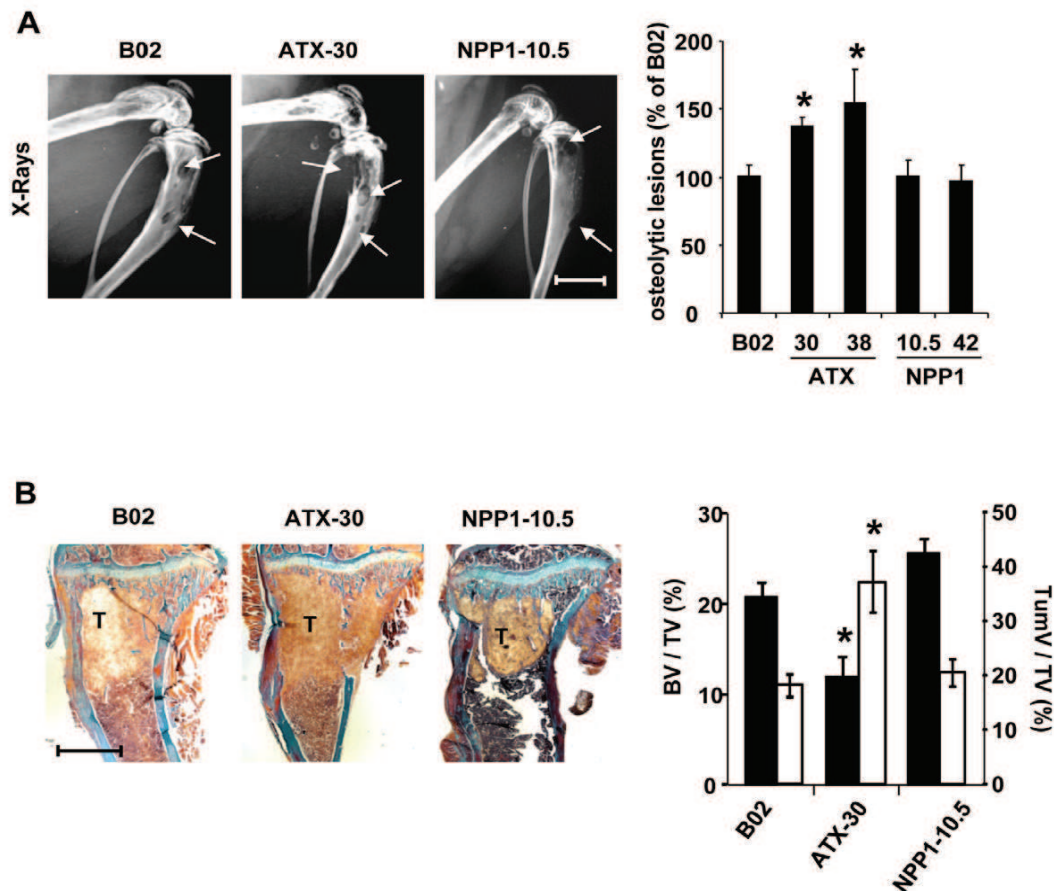


Figure 2. Effect of forced expression of autotaxin on osteolytic bone metastasis formation of MDA-B02 cells. (A) (Left panels) Representative radiographs of hind limbs from metastatic mice bearing MDA-B02 cells or MDA-B02-ATX clone no. 30 or MDA-B02-NPP1 clone no. 42, 29 days after tumor cell inoculation. Osteolytic lesions are indicated by arrows (scale bar: 0.5 cm). (Right panel) Quantification of osteolytic lesion areas on radiographs in metastatic animals. Data correspond to the mean $\pm$ SE of two independent experiments of 7 to 10 animals per group. (B) (Left panels) Representative bone histology of Goldner's trichrome-stained tibial metaphysis from metastatic animals. Bone is stained in blue; bone marrow and tumor cells are stained in red. (scale bar: 1 mm). (Right panel) Histomorphometric analysis of metastatic hindlimbs using the bone volume/tissue volume ratio (BV/TV, black bars and left axis) and the tumor volume/tissue volume ratio (TumV/TV, open bars and right axis) as referents. Values are the mean $\pm$ SE of 7–10 animals per group representative of two independent experiments. *, $P < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0009741.g002

To analyze the function of endogenous expression of autotaxin by breast cancer cells in bone metastasis formation we used the RNA interference method to establish a series of three clones of 4T1 cells with stably down-regulated autotaxin expression (4T1-siATX), together with three control 4T1 clones with unaltered expression of autotaxin (4T1-sbATX) (Figure 4C). Following individual characterization of each clone for the levels of protein expressions and lysoPLD activities, subsequent *in vitro* and *in vivo* experiments were carried out using pools of the three clones for the 4T1-siATX and the 4T1-sbATX cell lines, respectively.

As previously observed for MDA-B02 cells *in vitro* (Figure 1C), LPC exhibited a mitogenic action on 4T1 cells (Figure 4D). However, silencing of autotaxin expression did not alter the proliferation of 4T1-siATX cells compared to that observed for control and parental cell lines (Figure 4D). This result was rather surprising and might be the consequence of the remaining lysoPLD activity in 4T1-siATX clones. An alternative explanation would be that the proliferation of 4T1 cells was already maximally

stimulated by LPC. In contrast, using transwell migration chambers coated with MatrigelTM, we observed that silencing autotaxin expression inhibited FBS-driven invasion of 4T1-siATX cells (Figure 4E). This inhibition was overcome by the addition of LPA into the cell compartment of the migration chambers demonstrating that invasion of 4T1 cells was controlled by autotaxin through its lysoPLD activity.

Down-regulation of endogenous autotaxin expression in 4T1 cells inhibits osteolytic bone metastasis formation independently of primary tumor growth *in vivo*

To find out whether endogenous expression of autotaxin in breast cancer cells was important for bone metastasis formation, 4T1-siATX and control cell lines were injected into the left ventricle of the heart of female syngenic BALB/C mice. This strategy allows to bypass the lungs and to target the cells to other visceral organs and bone. Two weeks after cell inoculation, radiographic analyses revealed that animals bearing 4T1-siATX

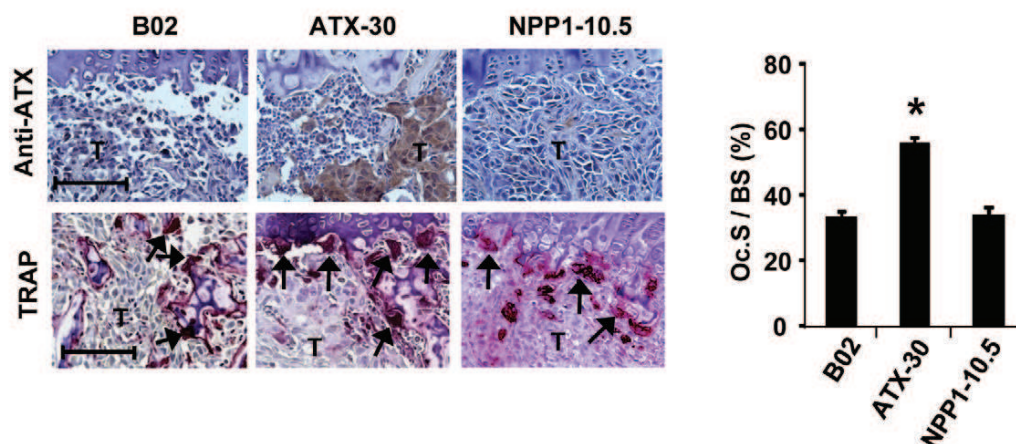


Figure 3. Effect of forced expression of autotaxin *in vivo* on MDA-B02 cells increased the formation osteoclasts at the bone metastatic site. (Upper left panels) Representative immunohistological examination of proximal tibia sections from metastatic animals 29 days after tumor cell inoculation, using the anti-ATX antibody 4F1. T indicates tumor cells. (Lower left panels) Representative histological examination of TRAP-stained proximal tibia sections from metastatic animals. T indicates tumor cells. Bone is stained in dark blue and osteoclasts are stained in red (arrows). (Right panel) Quantification of active-osteoclast resorption surface per trabecular bone surface (Oc.S/BS). Results are the mean $\pm$ SE of 8–9 animals per group. *: $P < 0.05$. Scale bars: 200 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0009741.g003

cells had a 50% decrease in the extent of osteolytic lesions, as compared to animals injected with 4T1-sbATX or 4T1 parental cells (Figure 5A). Histological analyses revealed that the surface of active osteoclasts per trabecular bone area located at the bone/tumor cell interface was significantly decreased in animals bearing 4T1-siATX cells, as compared to that observed in mice bearing parental or 4T1-sbATX tumor cells (Figure 5B). We have previously demonstrated that LPA is produced in the tumor microenvironment by platelets [4]. To analyze the role of endogenous autotaxin on breast cancer cells *in vivo* independently of the bone microenvironment, 4T1-siATX and control cell lines were inoculated into the fat-pad of female syngenic BALB/C mice. After two weeks, which corresponded to the same time frame of tumor growth than that used for bone metastasis experiments, primary tumors were collected. We observed that silencing autotaxin expression did not alter the growth of primary tumors since there was no significant difference in the size of 4T1-siATX tumors, as compared to those of 4T1-sbATX and parental tumors (Figure 6A). *In situ* immunodetection of the Ki-67 nuclear antigen in tumor sections did not show any difference in the proliferation of 4T1-siATX and control cells (Figure 6B). Altogether, these results indicated that endogenous expression of autotaxin controlled bone metastasis formation but not the growth of 4T1 cells *in vivo*.

In order to analyze the capacity of endogenous autotaxin to support the formation of spontaneous metastases by 4T1 cells *in vivo*, cells were injected into the mammary fat pad of female BALB/C mice. Primary tumors were grown for two weeks, at which time they were resected, allowing the emergence of spontaneous metastases. Three weeks after the resection of primary tumors, animals were sacrificed. Lungs were collected, fixed and embedded into paraffin. Lung tissue sections were examined under a microscope for the presence of metastatic foci. We found that mice inoculated with 4T1-siATX cells had a significantly lower number of lung metastases (80% reduction) as compared to mice inoculated with 4T1 parental cells (Figure 6C).

Altogether, these data indicated that the expression of endogenous autotaxin controlled the capacity of 4T1 breast cancer cells to metastasize and to induce the formation of osteolytic bone metastases independently of cell proliferation.

Expression of autotaxin mRNA in primary tumors of patients with breast cancers

We then asked whether the effects of autotaxin expression observed in mouse preclinical models of breast cancers could correlate with the human disease. We analyzed the expression of the autotaxin expressing gene (*ENPP2*) by real time quantitative PCR in a series of 167 breast tumor biopsies from patients without ($n = 145$) or with ($n = 22$) identified metastases at the time of diagnosis. We observed that the expression of *ENPP2* normalized to the genes encoding ribosomal protein L32 (L32) or TATA-box binding protein (TBP, data not shown), was not significantly modified in patients with bone or soft tissue metastases at the time of diagnosis, as compared with non-metastatic patients (Figure 7). We also found similar levels of *ENPP2* mRNA in primary tumors of non-metastatic patients that had developed bone or soft tissue metastases over a five-year period (Figure 7). Then, we investigated the expression of *ENPP2* in relation to the clinical, pathological and biological characteristics, as defined in Table 1. We found that even if the absolute median values of *ENPP2* transcript levels were consistently increased together with the characteristics of poor prognostics, the differences did not reach statistical significance. This indicated that the expression of *ENPP2* in primary tumors of breast cancer patients was independent of the tumor size, grade, node, estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) status (Table 1).

LPA controls directly osteoclast differentiation

We showed previously that LPA increases the potency of tumor cells to induce the differentiation of osteoclasts *in vitro* and their recruitment *in vivo* at the bone metastatic site [4]. *In vitro*, conditioned media collected from MDA-B02-ATX clones significantly enhanced the differentiation of mature osteoclasts from bone marrow cell precursors, as compared to conditioned media prepared from parental cells or MDA-B02-NPP1 clones (Figure 8A). Moreover, recombinant autotaxin increased significantly M-CSF/RANK-L-induced osteoclast differentiation *in vitro* (Figure 8B). To determine whether the effect of autotaxin was due to its lysoPLD activity, we used a β -substituted analogue of LPA

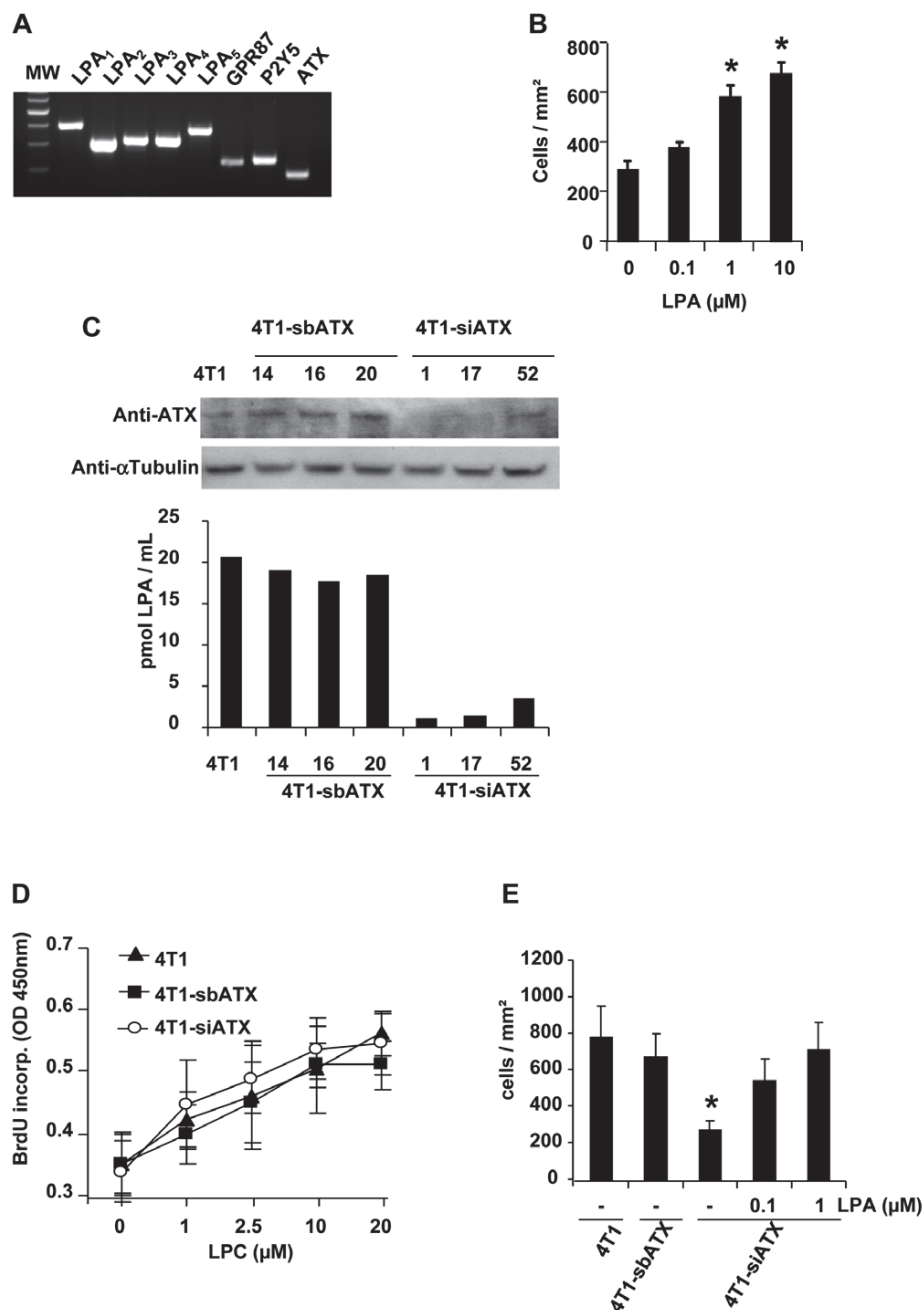


Figure 4. Characterization of silencing autotaxin expression in mouse breast carcinoma 4T1 cells. (A) RT-PCR amplification products for LPA receptors, LPA₁ (1), LPA₂ (2), LPA₃ (3), LPA₄ (4), LPA₅ (5), GPR87, P2Y5, and autotaxin (ATX) from 4T1 cells total RNAs were analyzed on a 2% agarose gel. MW, molecular weight marker. (B) Cell invasion was stimulated with increased LPA concentrations used as chemoattractant. Results are the mean $\pm$ SD of cells of 3 replicates and are representative of at least 3 independent experiments. Data are expressed as the number of cells/mm². (C) Autotaxin expression in 3 clones of 4T1 cells transfected with a pStrike vector coding for either irrelevant small hairpin RNAi (sbATX, clones no. 14, no. 16, no. 20) or specific small hairpin RNAi (siATX, clones no. 1, no. 17, no. 52). (Upper panel) Immunoblotting using anti-ATX polyclonal antibody or anti- α -tubulin as loading control. (Lower panel) LysoPLD activity (pmol LPA/mL) measured in cell culture conditioned media. (D) Cell proliferation assessed by BrdU incorporation of 4T1 cells and a pool of three 4T1-sbATX clones (no. 14, no. 16, no. 20) or three 4T1-siATX clones (no. 1, no. 17, no. 52), in response to increased concentrations of LPC. Results are expressed in mean $\pm$ SD of 6 replicates and are representative of 3 separate experiments. (E) Invasion assay. Cells were placed in presence or absence of LPA (0.1–1 μ M) in the upper chamber and FBS, used as chemoattractant, was placed in the lower chamber. Results are the mean $\pm$ SD of 3 replicates and are representative of at least 3 independent experiments. Data are expressed as the number of cells/mm². *, $P < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0009741.g004

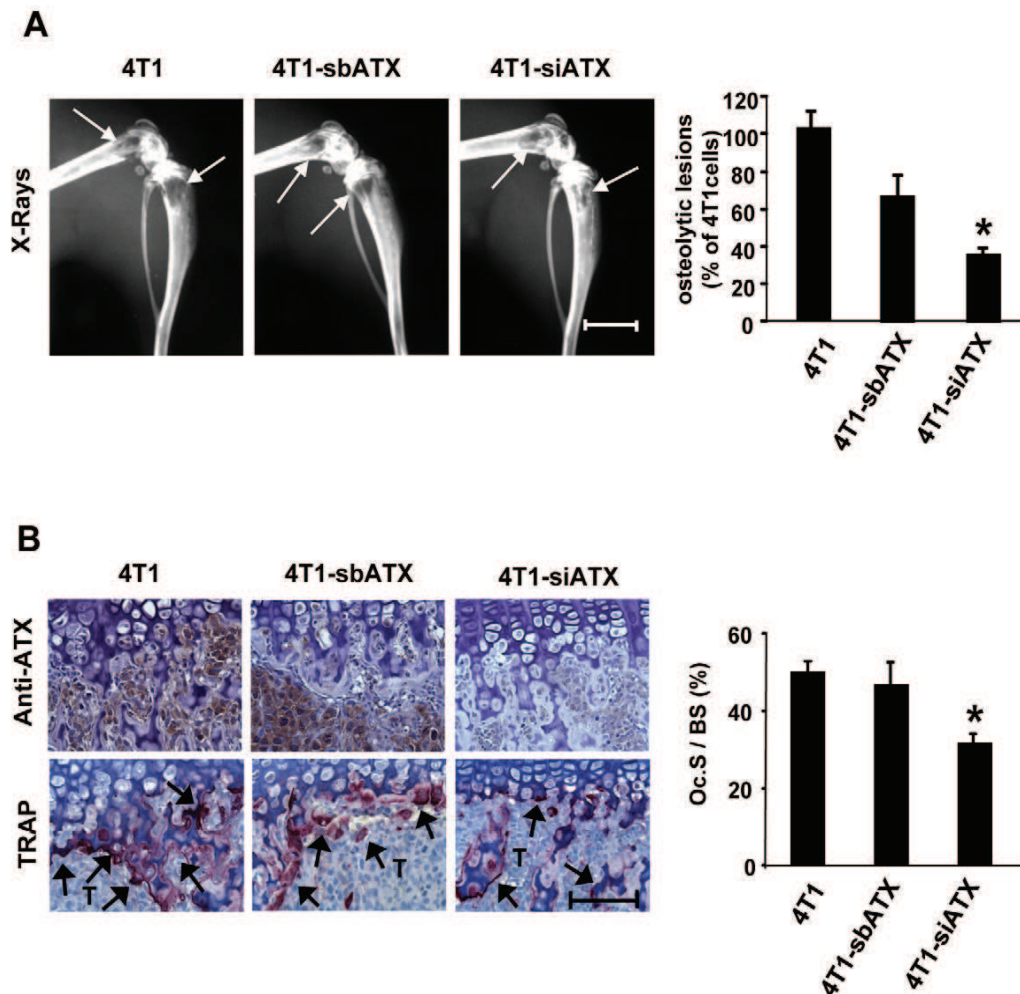


Figure 5. Effect of silencing autotaxin expression on osteolytic bone metastasis formation of 4T1 cells. (A) (Left panels) Representative radiographs of hind limbs from BALB/C mice 14 days after intracardiac injection of 4T1 parental cells or pools of 4T1-sbATX clones (no. 14, no. 16, no. 20) or 4T1-siATX clones (no. 1, no. 17, no. 52). Osteolytic lesions are indicated by arrows. (Right panel) Quantification of osteolytic lesion areas. Values are expressed as the % of lesion areas compared to parental 4T1 cells. Data correspond to the mean $\pm$ SE of two independent experiments of 8 to 10 animals per group. *, $P < 0.05$. (B) (Left upper panels) Representative immunohistological examination of proximal tibia sections from metastatic animals 14 days after tumor cell inoculation, using the anti-ATX antibody 4F1. T indicates tumor cells. (Lower left panels) Representative histological examination of TRAP-stained proximal tibia sections from metastatic animals. T indicates tumor cells. Bone is stained in dark blue and osteoclasts are stained in red (arrows). (Right panel) Quantification of active-osteoclast resorption surface per trabecular bone surface (Oc.S/BS). Results are the mean $\pm$ SE of 8–10 animals per group. *, $P < 0.05$. Scale bars: 200 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0009741.g005

(vpc8a202) described as a specific inhibitor [30]. We observed that vpc8a202 inhibited the autotaxin-dependent increased osteoclastogenesis from bone marrow cells treated with M-CSF and RANK-L (Figure 8B). We showed previously that LPA controls indirectly breast cancer cell-induction of osteoclastogenesis through the secretion of pro-osteoclastic cytokines, IL-6 and IL-8, by tumor cells [4]. Serum is required for full osteoclast differentiation upon stimulation osteoclast precursors with M-CSF/RANK-L *in vitro* [31]. Serum contains high amounts of both LPA and LPC [32]. Therefore, our results suggested that LPA generated by autotaxin in the presence of serum might control directly osteoclast differentiation. To test this hypothesis, we treated fetal bovine serum with activated charcoal in order to remove all lipid fractions. We observed that lipid-depleted serum was not able to support osteoclastogenesis induced by M-CSF/RANK-L (Figure 8C). This inhibitory effect of lipid-depleted

serum was rescued by the addition of purified LPA in the culture media (Figure 8C). This result indicated that LPA was required for serum/M-CSF/RANK-L induced osteoclastogenesis.

Discussion

In this study we demonstrated that expression of autotaxin controlled the progression of osteolytic bone metastases induced by breast cancer cells. We showed previously that lysophosphatidic acid (LPA) produced in the tumor microenvironment controls the progression of osteolytic bone metastases of breast cancer cells and highlighted the important role of blood platelets in this process [4]. However, the molecular mechanisms involved in the production of LPA and the direct role of LPA on bone cells at the bone metastatic site are still unknown. Knockout animal analyses revealed that autotaxin controls the levels of LPA in the blood

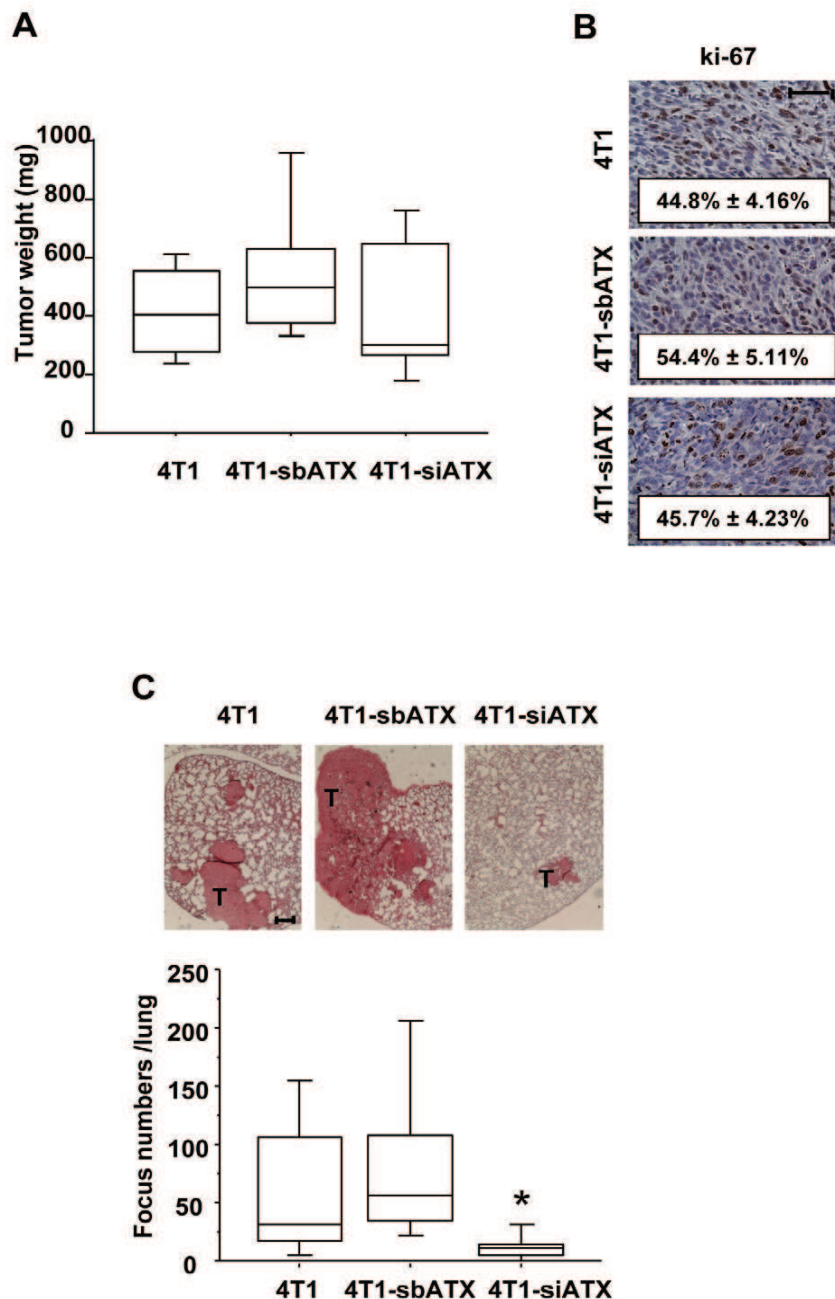


Figure 6. Effect of autotaxin expression in orthotopic primary tumor growth and spontaneously metastasis dissemination of mouse 4T1 cells. 4T1 parental cells, 4T1-sbATX clones and 4T1-siATX clones were injected in the mammary gland of normal syngenic female BALB/C mice. At day 14, primary tumors were resected, and weighed. (A) Box plots represent tumor weight (in mg). (B) Primary tumors were embedded in paraffin. Tumor tissue sections were analysed by immunohistochemistry using a specific antibody directed against the nuclear ki-67 antigen. The mitotic index (numbers in each panel) was calculated as the percentage of nuclei positive for ki-67 (results are the mean $\pm$ SD, scale bar: 50 μ m). (C) Animals were sacrificed 35 days after tumor cell injection and lungs were collected to quantify spontaneously metastasis formation of 4T1 cells. (Upper panels) representative photographs of lung tissue sections stained with eosin. (Lower panel) Quantification of lung metastasis foci. The number of metastatic foci was enumerated under microscope. $P < 0.05$. T indicates metastatic foci. Scale bar: 200 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0009741.g006

circulation [8,9]. Forced expression of autotaxin in human breast cancer MDA-MB231 cells increased the formation of osteolytic bone metastases in mice, whereas knockdown expression of endogenous

autotaxin in mouse mammary tumor 4T1 cells decreased the extent of osteolytic lesions. It is known for two decades that platelets are an abundant source of LPA in the serum [33,34].

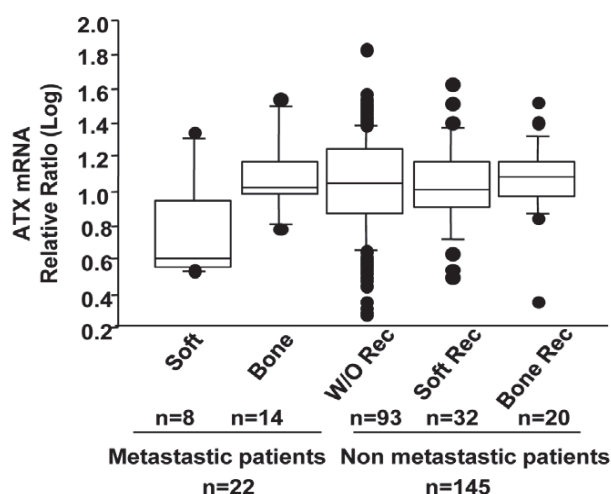


Figure 7. Expression of autotaxin mRNA in primary tumors of breast cancer patients. Total RNA were extracted from primary breast tumor biopsies of patients without or with metastases at the time of diagnosis. Soft and Bone represent subsets of metastatic patients with soft tissue only and bone metastases, respectively. W/O Rec represent a subset of non metastatic patients with no recurrence of metastasis during a five year period. Soft Rec and Bone Rec represent subsets of patients with recurrence of metastases to soft tissue only and to bone over a five year period, respectively. n indicates the numbers of patients in each group. Expression of *Enpp2*/ATX mRNA was measured by real-time quantitative by real time PCR. Quantifications were normalized to corresponding L32 RNA values. Data are given as box plots with the median. The box encompasses the 25th to 75th percentiles. The 5th percentiles are displayed as error bars. doi:10.1371/journal.pone.0009741.g007

However, Aoki's group demonstrated that LPA released directly by platelets represents only a small part of serum LPA [32]. Platelet-derived LPA is produced mainly through the action of plasma lysophospholipase D (e.g. autotaxin) on LPA precursors (LPC, lysophosphatidylethanolamine, and lysophosphatidylserine) released by activated platelets [32]. Therefore, in the context of osteolytic bone metastasis progression, the procoagulant activity of breast cancer cells is likely to induce the release of both LPA and LPA precursors upon platelet aggregation. In agreement with a local transformation of LPA precursors into LPA by tumor cell-derived autotaxin that subsequently would act as a paracrine/autocrine factor, we found increased tumor burden and osteoclast-mediated bone resorption in animals bearing autotaxin-expressing tumors.

Expression of *ENPP2* was detected among the set of genes that are specifically upregulated in rat bone tissue under permanent infusion with PTH(1–34) fragment [35]. Continuous exposure to PTH increases bone resorption, hypercalcemia and bone loss [36]. It is tempting to hypothesize that autotaxin would be involved in the control of osteoclast activity and bone resorption. The number of osteoclasts was specifically increased at the interface between tumors and bone in metastatic mice bearing autotaxin-expressing tumors. This could be due to an indirect action of autotaxin via an autocrine/LPA-dependant activation of tumor cells and the release of pro-osteoclastic factors [4,5]. However, we observed that incubation of bone marrow cells *in vitro* with autotaxin-containing tumor cell conditioned media or recombinant autotaxin enhanced M-CSF/RANK-L induced differentiation of mature osteoclasts, indicating that through its lysoPLD activity

autotaxin might also control directly osteoclastogenesis. Bone cells were shown to be activated by LPA [37]. LPA has a mitogenic and chemotactic activity on osteoblasts and induces dentritic outgrowth of osteocytes [38,39,40]. LPA was also shown to cooperate with 1 α , 25(OH)Vitamin D to stimulate osteoblastic cell activities [41]. Here, we found that LPA present in the serum was required to form mature osteoclasts *in vitro* from bone marrow cell precursors. Therefore, in addition to a role on tumor growth, both at primary and bone metastatic sites, LPA might also control the progression of osteolytic bone metastases through a direct action on bone cells (Figure 9).

Human MDA-MB-231 cells used in our study do not express autotaxin at steady state, indicating that expression of autotaxin was not involved in the tropism of breast cancer cells to the bone tissue. This might explain why expression of autotaxin gene (*ENPP2*) was not identified among the set of genes that defined the gene signature of bone-seeking breast cancer cells [42,43]. However, expression of autotaxin both in human and mouse breast cancer cells controlled the progression of osteolytic lesions, once located in the bone tissue. Bone metastasis is the site of complex cross-interactions occurring between tumor cells and the bone microenvironment. Genes encoding for parathyroid hormone related protein (PTHrP), cyclo-oxygenase 2 (Cox2) and osteomimetic factors by tumor cells do not belong to the gene signature of bone-seeking breast cancer cells, but are known to play active roles during the progression of bone metastases [44,45,46]. Our results strongly suggest that autotaxin belongs to these additional factors that control the expansion of osteolytic bone metastases in breast cancers.

Taghavi and collaborators observed that LPA receptors are conditionally tumorigenic in mice [47]. A recent study showed that transgenic overexpression of autotaxin or LPA1-3 receptors in the mouse mammary gland is sufficient to initiate breast cancers in mice, demonstrating that activation of the autotaxin/LPA track induces carcinogenesis [25]. This confirms previous reports indicating that expression of autotaxin is increased in tumors compared to normal tissues of origin [26]. However, the role of the autotaxin/LPA axis during the progression of breast cancers in human is not well characterized yet. Increased expression of LPA₂ and LPA₃ receptors correlates with late stages of ovarian cancers, whereas expression of LPA₁ receptor links to the inhibition of the progression of ovarian tumors. Specific variation of LPA receptor expression was not found in DNA microarray databases of different stages and grades of breast cancers, suggesting that LPA receptors are more prone to control primary tumor progression of ovarian tumors than breast cancers [48]. We found that the autotaxin transcript levels in primary tumors of breast cancer patients was an independent factor from the tumor size, grade, metastasis, node, ER and PgR status. This suggested that autotaxin expression would not be predictive for both the progression and metastatic dissemination of breast cancer tumors.

In conclusion, in addition to the predominant role of autotaxin/LPA track in the carcinogenesis of breast cancers our results demonstrated that activation of autotaxin/LPA axis in breast cancer cells controlled the progression of osteolytic bone metastases by stimulating directly both cancer cells and osteoclasts. Osteophytic cancers such as breast, thyroid, prostate and lung cancers, share many common mechanisms during the progression of bone metastases [2]. In addition, expressions of autotaxin and LPA receptors are detected in these types of cancers [21,23,49]. Altogether, our results suggested that targeting autotaxin/LPA track might contribute to the development of new therapies to improve the care of patients with osteophytic solid tumors.

Table 1. Distribution of ATX mRNA in different subsets of cases defined by classical prognostic parameters in primary tumors of metastatic patients with bone metastases and of non metastatic patients without metastasis recurrence.

		Patients with bone metastases			Patients without metastasis recurrence		
		n = 14			n = 93		
		n	Median	p*	n	Median	p*
<i>Menopausal status</i>	pre	2	10.44	0.715	60	10.88	0.585
	post	12	10.36		33	11.69	
<i>Surgical tumor size</i>	pT1	3	9.88	0.750	35	11.30	0.750
	≥ pT2	9	13.43		55	10.88	
<i>Histological type</i>	ductal	12	10.36	0.285	77	11.30	0.823
	lobular	1	8.15		13	12.19	
<i>Histological grade**</i>	G1	1	6.01	0.248	11	8.46	0.394
	GII	6	14.18		39	10.87	
	GIII	5	10.08		20	14.24	
<i>Node status</i>	pN0	0		0.160	38	10.87	0.160
	pN+	11	10.079		55	11.95	
<i>ER status</i>	Positive	9	9.78	0.123	83	11.00	0.535
	Negative	4	12.78		10	13.03	
<i>PgR status</i>	Positive	7	9.72	0.063	74	10.90	0.429
	Negative	6	12.03		19	14.76	

Data are expressed as the median of ATX/L32 mRNA ratio.

*p values were obtained using the non parametric Mann & Whitney test.

**in ductal carcinomas only and p values were obtained using the non parametric Kruskal-Wallis test.

doi:10.1371/journal.pone.0009741.t001

Materials and Methods

Ethics statement

The mice used in our study were handled according to the rules of Décret N° 87-848 du 19/10/1987, Paris. The experimental protocol have been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Université Claude Bernard Lyon-1 (Lyon, France). Studies were routinely inspected by the attending veterinarian to ensure continued compliance with the proposed protocols. BALB/C and BALB/C nude mice, 4 weeks of age, were housed under barrier conditions in laminar flow isolated hoods. Autoclaved water and mouse chow were provided ad libitum. Animals bearing tumor xenografts were carefully monitored for established signs of distress and discomfort and were humanely euthanized when these were confirmed. Studies involving human primary breast tumors were performed according to the principles embodied in the Declaration of Helsinki. Tissue biopsies were obtained as part of surgical treatments for the hormone receptor content determination. Remaining samples were included anonymously in this study. All human experiments were approved by the Experimental Review Board from the Laennec School of Medicine that waived the need for consent.

Drugs and reagents

Lysophosphatidic acid (LPA, Oleoyl C18:1) and lysophosphatidylcholine (LPC) were obtained from Avanti Polar Lipids. Activated charcoal was obtained from VWR international. The competitive inhibitor of LPA signaling pathways dependent on LPA₁ and LPA₃ receptors, Ki16425, was obtained from DebiopharmGroup. Vpc8a202 was kindly provided by Pr. K.R. Lynch (University of Virginia, Charlottesville, VA)[30]. Recombinant Human autotaxin was purchased from R&D System.

Cell lines and transfection

Cell lines (MDA-B02 and 4T1) and transfectants were cultured in complete media, DMEM medium (Invitrogen), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Perbio) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), at 37°C in a 5% CO₂ incubator. Human MDA-MB-231 and mouse 4T1 breast cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. Characteristics of MDA-MB-231/B02 (MDA-B02) breast cancer cells were described elsewhere [50]. The cDNA encoding the rat autotaxin and mice NPP1 were amplified by PCR using the plasmid HA-RnNPP2-Myc and HA-NPP1-Myc as a template and 2 oligonucleotide primers (5'-GCAGAGCTGGTTTGTAGTGAAC-3' and 5'-CCTCTACAAATGTGGTATATGGC-3'). The bidirectional vectors pBiL/ATX and pBiL/NPP1 were constructed by inserting into the pBiL plasmid (Clontech) the NotI/NheI PCR fragment encoding the autotaxin and NPP1 sequence, respectively. MDA-MB-231/B02-tet-Off cells were cotransfected with pBiL/ATX or pBiL/NPP1 together with a vector conferring puromycin resistance (pPur; Clontech). Selection of the clones was obtained after growing the cells for 2 weeks in the presence of puromycin (2 µg/mL). Luciferase induction was used to select clones among stable transfectants. Two autotaxin transfectants (clones no. 30 and 38) and two NPP1 transfectants (clones no. 10.5 and 41) were used in the present study.

We designed small hairpin RNAs (siRNA) and corresponding ShRNA sequences directed to autotaxin mRNA target sites based on the mouse sequence (GenBank accession NM_015744) using the siRNA TARGET DESIGNER (Promega). Pairwise oligonucleotides for mouse siRNA-ATX 5'-ACCGCCATCGGCGT-CAATCTCTAAGTTCTCTAGAGATTGACGCCGATGGCT-TTTTCC-3', 5'-TGCAGAAAAAGCCATCGGCGTCAATCTCTAGAGAACTTAGAGATTGATTGACGCCGATGG-3' (target nucleotide site: 97–115) as well as control oligonucleotides with scrambled sequences (sbl-ATX) were cloned into psiSTRIKE puromycin vector containing the U6 promoter (Promega). Plasmids were transfected into 4T1 cells using the Transfast

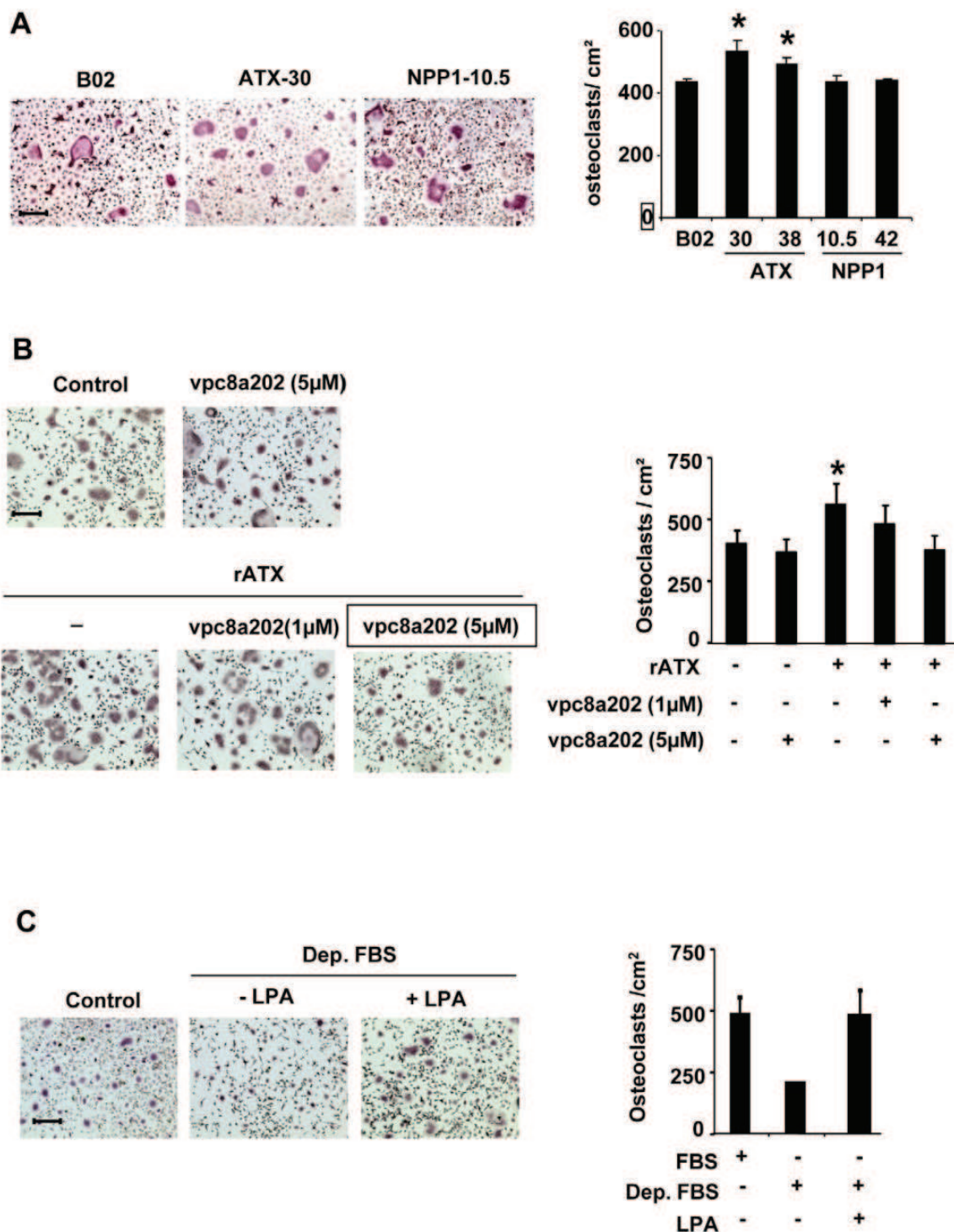


Figure 8. Effect of lysoPLD activity of autotaxin on osteoclastogenesis. (A) Bone marrow cells were cultured in presence of FBS (10%), mouse M-CSF, RANK-L and MDA-B02 cell or MDA-B02-ATX clone #30 or MDA-B02-NPP1 clone #10.5 conditioned media. (B) Bone marrow cells were cultured in presence of FBS (10%), mouse M-CSF, RANK-L and recombinant ATX, in absence (-) or presence of increasing concentrations of ATX inhibitor, vpc8a202. (C) Bone marrow cells were cultured in presence of mouse M-CSF, RANK-L and FBS (Control) or lipid-depleted FBS (Dep. FBS) in absence or presence of 1-Oleoyl-LPA (1 µM). (Left panels) Representative images of multinucleated cells stained for the TRAP activity. (Right panels) Quantification of osteoclast number was based on the multinucleation of TRAP-positive cells. Results are the mean $\pm$ SD of 3 separate experiments. *: $P < 0.05$. Scale bars: 200 µm.

doi:10.1371/journal.pone.0009741.g008

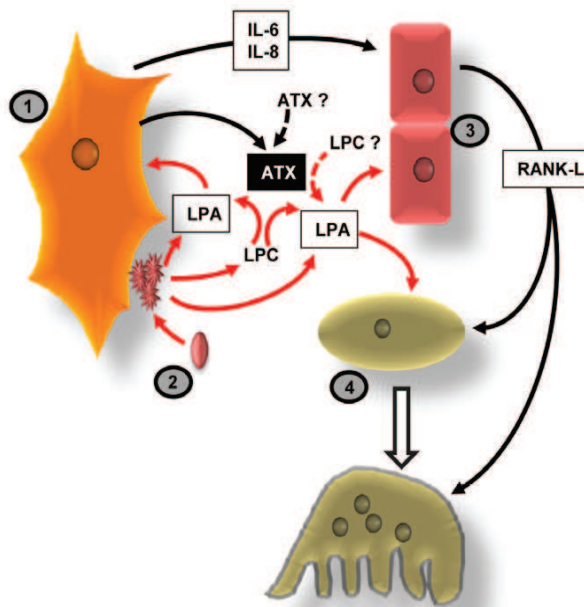


Figure 9. Schematic representation of LPA/autotaxin effects on the progression of osteolytic bone metastases. Bone-residing breast cancer cells (1) induce platelet (2) aggregation and the release of LPA and LPA precursors (LPC) from activated platelets. Platelet-derived LPA and LPA derived from autotaxin (ATX) lysoPLD activity secreted by cancer cells can act on tumor cells to stimulate both tumor growth and the production of IL-6 and IL-8, which in turn induce the expression of RANK-L by osteoblasts (3) that stimulate osteoclast precursors (4) differentiation and osteoclast-mediated bone resorption. Platelet-derived LPA and LPA derived from ATX activity can act directly on osteoblasts to stimulate migration and proliferation, and on osteoclast precursors to stimulate osteoclastogenesis. Dotted arrows indicate unknown origin.

doi:10.1371/journal.pone.0009741.g009

reagent (Promega). Cells were cultured for 2 weeks in presence of puromycin (2 μ g/mL) and 4T1-siATX and 4T1-sbl clones were isolated using cloning cylinders. Autotaxin expression was assessed by western-blotting and measure of lyso-PLD activity. Three 4T1SiRNA-ATX stable transfectants (clones no. 1, 17 and 52) and three 4T1SblRNA-ATX stable transfectants (clones no. 14, 16 and 20) were used in the present study.

Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA from 4T1 cells were extracted using Nucleospin RNAII kit (Macherey-Nagel) and cDNA were synthesized using iScript cDNA Synthesis kit (Biorad). PCR reactions were run using SYBR[®] Green qPCR kit and sets of specific primers, LPA1-F (5'-ATCTTTGGC-TATGTTTCGCCA-3') and LPA1-R (5'-TTGCTGTGAACATC-CAGCCA-3') for LPA₁; LPA2-F (5'-GTCAAGACGGTTGTCAT-CATTCT-3') and LPA2-R (5'-GAAGCATGATCCGCGTGCT-3') for LPA₂; LPA3-F (5'-GAAGCATGATCCGCGTGCT-3') and LPA3-R (5'-TCATGATGGACATGTGTGTTTGC-3') for LPA₃; LPA4-F (5'-GCATTGTTGACATTAGTGTTGGA-3') and LPA4-R (5'-AACCTGGCCCTCTCTGATTT-3') for LPA₄; LPA5-F (5'-CCGTACATGTTTCATCTGGAAGAT-3') and LPA5-R (5'-CA-GACTAATTTCTCTTCCACCT-3') for LPA₅; GPR87-F (5'-CA-GACTAATTTCTCTTCCACCT-3') and GPR87-R (5'-GGGG-ATTCTGCACAAGTGAT-3') for GPR87; P2Y5-F (5'-GAGCAG-

TCCCAGTGGCTTAG-3') and P2Y5-R (5'-TGTTTCCAACCTG-CTGCTTTG-3') for P2Y5; ATX-F (5'-GCCCTGATGTCCGTG-TATCT-3') and ATX-R (5'-CGTTTGAAGGCAGGTACAT-3') for autotaxin. Complementary DNAs were amplified by PCR for 35 cycles and PCR products were analyzed by electrophoresis on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. Expression of Enpp2/ATX mRNA was quantified by real-time quantitative RT-PCR on an Eppendorf Mastercycler[®] RealPlex (Invitrogen) using the SYBR[®] Green PCR kit (Finnzymes). Quantifications were normalized to corresponding RNA L32 and TBP values. The cDNAs were amplified by PCR for 35 cycles with the following specific PCR primers: human ATX, 5'-ACAACGAGGAGAGCTGCAAT-3' (forward) and 5'-AGAAGTCCAGGCTGGTGAGA-3' (reverse); Human L32, 5'-CAAGGAGCTGGAAGTGCTGC-3' (forward) and 5'-CAGCTCT-TTCCACGATGGC-3' (reverse); Human TBP, 5'-TGGTGTGCA-CAGGAGCAAG-3' (forward) and 5'-TTCACATCACAGCTCC-CAC-3' (reverse). Each cycle consisted of 10 s of denaturation at 95°C, 15 s of annealing at 67°C, and 10 s of extension at 72°C.

Quantification of lysophospholipase D (lysoPLD) and phosphodiesterase (PDE) activities

lysoPLD activity was measured by conversion of radiolabeled LPC into radiolabeled LPA as described previously [51]. Briefly, a solution of [¹⁴C]palmitoyl-lysophosphatidylcholine at 0.0025 μ Ci/ μ L in DMEM supplemented with 1% free acid BSA was first prepared, and 20 μ L of this solution was incubated with 500 μ L of thawed CM plus 1 μ L of sodium orthovanadate for 90 min at 37°C. At the end of the incubation period, phospholipids were extracted with 500 μ L of 1-butanol, evaporated, spotted on a silica gel 60 TLC glass plate, and separated using CHCl₃/MeOH/NH₄OH (60:35:8) as the migration solvent. The plate was autoradiographed overnight at -80°C using Biomax-MS film (Kodak) to localize radiolabeled LPA spots, which were scraped and counted with 3 mL of scintillation mixture. Nucleotide phosphodiesterase activities were determined from the release of *p*-nitrophenolate from *p*-nitrophenyl thymidine 5'-monophosphate. Briefly, the samples were incubated at 37°C with 5 mM of the substrate, 5 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂ and 100 mM Tris/HCl at pH 9.0 in a total volume of 35 μ L. The reaction was stopped by the addition of 200 μ L of 3% (v/v) trichloroacetic acid. Subsequently, the mixture was neutralized with NaOH and *p*-nitrophenolate was quantified colorimetrically at 405 nm.

Western-blot analysis

Cells were cultured in 5 ml DMEM without FBS for one day. Conditioned culture media were concentrated to 60 μ L using Centicon-Y30 (Millipore). Cell lysates were prepared from cells cultured in complete medium. Protein were electrophoresed on a 7% SDS polyacrylamide gel and transferred onto an Immobilon transfer membrane (Millipore). Membranes were incubated with 5% low fat-milk and 0.1% Triton X-100, pH 7.4 in PBS for one hour at room temperature followed by an overnight incubation with anti-ATX antibody (Cayman) or with anti- α -tubulin antibody (Sigma Aldrich). Autotaxin and α -tubulin were visualized using horseradish-peroxidase-donkey anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG (Amersham) and enhanced chemiluminescence (Amersham). For detection of HA-NPP1-myc, non-specific binding sites were blocked with 3% bovine serum albumin (Serva) and 0.1% Tween-20 in PBS. Following overnight incubation with anti-Myc (clone 9E10) monoclonal antibodies, HANPP1myc was visualized using horseradish-peroxidase-goat anti-mouse IgG (Dako) and enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer).

Cell proliferation assay

Experiments were carried out in conditions described previously [23]. Briefly, MDA-B02 cells (8×10^3) and 4T1 cells (2.5×10^3) were seeded in 48-well and 96-well plates, respectively, and cultured in complete medium for 24 h. Then, cells were synchronized in the presence of serum-free medium for 24 h. Then, cell proliferation was evaluated following BrdU incorporation for 7 h and the use of the cell proliferation ELISA kit (Roche).

Cell invasion assay

Invasion assays were carried out using Bio-Coat migration chambers (Becton Dickinson) with 8 μ m filters previously coated with Matrigel as described previously [52]. MDA-B02 cells (5×10^4) or 4T1 cells (2.10^5) were plated in the upper chambers and the chemoattractant (10% FBS) in the lower chambers. After incubation for 24 h at 37°C in 5% CO₂ incubator, cells that had migrated through the filters were fixed and stained. The membranes were mounted on glass slides, and cells from 10 random microscopic fields (x400 magnification) were counted. All experiments were run in duplicate, and invasion was expressed in terms of cells/mm².

Patients and tumor characteristics

Patients were selected according to the following criteria: primary breast tumor without inflammatory feature, no previous treatment. Patients tumors were provided by three medical centers (Centre Hospitalier Régional Annecy, Chirurgie Oncologique Centre Hospitalier Universitaire Lyon-Sud, and Clinique Mutualiste Saint Etienne, France) in which patients were included between October 1994 and October 2001. Two groups of patients were defined according to identified metastases at the time of diagnosis (n=22) or no identified metastases (n=145). Breast cancer tissue biopsies were obtained by surgery, selected by the pathologist and immediately stored in liquid nitrogen until processing. The biopsies were pulverized using a "Mikro-Dismembrator" (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) and total RNAs were extracted using TRI Reagent (Sigma, St Louis, MO). To remove any genomic DNA contamination, total RNAs were treated with RNase-free DNase I and purified using RNeasy micro columns (Qiagen, Hilden, Germany). RNAs quality was verified using an Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Animal studies

Bone metastasis experiments using MDA-B02 cells and transfectants were performed in female BALB/C nude mice of 4 weeks of age as previously described [4]. Cells were suspended at a density of 5×10^5 cells in 100 μ l of PBS and inoculated intravenously into animals. Bone metastasis experiments using 4T1 cells and transfectants were performed using female BALB/cByJ mice of 6 weeks of age. Cells were suspended at a density of 10^5 cells in 100 μ l of PBS and administered to the animals by intracardiac injection. Radiographs (LifeRay HM Plus, Ferrania) of animals were taken at day 28 and 14 after inoculation with MDA-B02 cells and 4T1 cells, respectively, using a cabinet X-ray system (MX-20; Faxitron X-ray Corporation). Then, animals were sacrificed by cervical dislocation and metastatic hind limbs were collected for histology and histomorphometric analyzes. Areas of osteolytic lesions were measured using the computerized image analysis system MorphoExpert (Exploranova). The extent of bone destruction for each animal was expressed in mm².

Tumor pad experiments were performed using 4T1 parental cells or pools of 3 independent clones of 4T1-siRNA-ATX or 4T1-

siRNA-ATX cells (10^5 in 10 μ l of PBS) injected into the fat pad of the 4th mammary gland of female BALB/C mice of 6 weeks of age (Charles River). Tumor weights were determined 14 days after inoculation. For spontaneous metastasis dissemination studies 14 days after tumor cell injection, animals were anesthetized and primary tumors were surgically removed. Mice were then followed for an additional 3-week observation at which time they were sacrificed and lungs collected for histological analysis.

Bone histomorphometry and histology

Hind limbs from animals were fixed, decalcified with 16% EDTA and embedded in paraffin. Five- μ m tissue sections were stained with Goldner's Trichrome and proceeded for histomorphometric analyzes to calculate the BV/TV ratio (percentage of bone tissue) and the TmV/TV ratio (percentage of tumor tissue). The *in situ* detection of osteoclasts was carried out on metastatic bone tissue sections using the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity kit assay (Sigma). The resorption surface (Oc.S/BS) was calculated as the ratio of TRAP-positive trabecular bone surface (Os.S) to the total trabecular bone surface (BS) using the computerized image analysis system MorphoExpert (Exploranova).

Immunohistochemistry

Resected primary tumors and metastatic hind limbs were fixed and embedded in paraffin. Five μ m sections were subjected to immunohistochemistry using a rat anti-mouse Ki67 monoclonal antibody that specifically recognizes proliferative cells (DakoCytomation) and a rat anti-ATX monoclonal antibody (clone 4F1). Sections were de-paraffinized in methylcyclohexan, hydrated through a graded series of ethanol, then immersed in a peroxidase blocking reagent (DakoCytomation) 5 min. Sections were incubated with normal goat serum for 30 min and incubated overnight at 4°C in humid chambers with primary antibody to Ki67 (dilution 1:25) and to ATX (dilution 1:200). The slides were incubated with biotinylated polyclonal rabbit anti-rat immunoglobulin (DakoCytomation) for 45 min. After washing, the slides were treated with peroxidase conjugated streptavidin (DakoCytomation) for 45 min and developed by addition of a solution of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DakoCytomation). Light counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin. The number of nuclei immunostained for Ki-67 was counted under a microscope. The mitotic index was calculated as the ratio of the number of Ki-67 positive nuclei to the total nucleus number per field and expressed as the percentage of Ki-67-positive nuclei.

Osteoclastogenesis assay

Bone marrow cells from hind limbs of OF1 male mice were collected and seeded in 12-well tissue culture plates at a density of 2×10^5 cells per well in α -MEM medium (Invitrogen) supplemented with macrophage-CSF (R&D Systems), receptor-activated nuclear receptor factor κ B ligand (RANK-L). Culture media were then supplemented with 10% FBS, lipid-depleted FBS or conditioned media collected from tumor cells, in presence or absence of 1-oleoyl LPA, recombinant autotaxin or vpc8a202. After 6 days, mature osteoclasts were enumerated under a microscope on the basis of the number of nuclei (more than three nuclei) and the tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity (Sigma). Results were expressed as the number of osteoclasts per cm².

Statistical analysis

Data were analyzed with the Stat-View 5.0 software using unpaired Student's *t* test for *in vitro* and *in vivo* studies, and the non parametric Mann Whitney test or Kruskal-Wallis test for the

clinical study. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgments

The authors thank the CeCIL platform (IFR62, Faculté de Médecine Laennec, Lyon, France) for technical assistance and Pr. K.R. Lynch for providing us with autotaxin inhibitor vpc8a202.

References

- Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 5: 591–602.
- Mundy GR (2002) Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2: 584–593.
- Hillner BE, Ingle JN, Berenson JR, Janjan NA, Albain KS, et al. (2000) American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. *American Society of Clinical Oncology Bisphosphonates Expert Panel. J Clin Oncol* 18: 1378–1391.
- Boucharaba A, Serre CM, Gres S, Sauhnier-Blache JS, Bordet JC, et al. (2004) Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* 114: 1714–1725.
- Boucharaba A, Serre C-M, Guglielmi J, Bordet J-C, Clezardin P, et al. (2006) The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 9643–9648.
- Stefan C, Jansen S, Bollen M (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30: 542–550.
- Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, et al. (2002) Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 277: 39436–39442.
- van Meesteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, et al. (2005) Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 25: 5015–5022.
- Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, et al. (2006) Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 281: 25822–25830.
- Zhao C, Fernandes MJ, Prestwich GD, Turgeon M, Di Battista J, et al. (2008) Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synovial cells: implications for rheumatoid arthritis? *Mol Pharmacol* 73: 587–600.
- Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, et al. (2008) Lysophosphatidylcholine induces neuropathic pain through an action of autotaxin to generate lysophosphatidic acid. *Neuroscience* 152: 296–298.
- Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, et al. (2007) Plasma lysophosphatidic acid level and serum autotaxin activity are increased in liver injury in rats in relation to its severity. *Life Sci* 81: 1009–1015.
- Boucher J, Quilliot D, Praderes JP, Simon MF, Gres S, et al. (2005) Potential involvement of adipocyte insulin resistance in obesity-associated up-regulation of adipocyte lysophospholipase D/autotaxin expression. *Diabetologia* 48: 569–577.
- Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, et al. (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 267: 2524–2529.
- Murata J, Lee HY, Clair T, Krutzsch HC, Arestad AA, et al. (1994) cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 269: 30479–30484.
- Yang SY, Lee J, Park CG, Kim S, Hong S, et al. (2002) Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 19: 603–608.
- Nam SW, Clair T, Campo CK, Lee HY, Liotta LA, et al. (2000) Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene* 19: 241–247.
- Lee HY, Murata J, Clair T, Polymeropoulos MH, Torres R, et al. (1996) Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 714–719.
- Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J, Woyke T, Berens TJ, et al. (2005) Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* 7: 7–16.
- Kawagoe H, Stracke ML, Nakamura H, Sano K (1997) Expression and transcriptional regulation of the PD-1alpha/autotaxin gene in neuroblastoma. *Cancer Res* 57: 2516–2521.
- Yang Y, Mou L, Liu N, Tsao MS (1999) Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 216–222.
- Singh AD, Sisley K, Xu Y, Li J, Faber P, et al. (2007) Reduced expression of autotaxin predicts survival in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 91: 1385–1392.
- Kehlen A, Englert N, Seifert A, Klonisch T, Dralle H, et al. (2004) Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 109: 833–838.
- Zhang G, Zhao Z, Xu S, Ni L, Wang X (1999) Expression of autotaxin mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 112: 330–332.
- Liu S, Umez-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, et al. (2009) Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* 15: 539–550.
- Umez-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, et al. (2002) Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 158: 227–233.
- Clair T, Lee HY, Liotta LA, Stracke ML (1997) Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities. *J Biol Chem* 272: 996–1001.
- Sin WC, Zhang Y, Zhong W, Adhikarakumathu S, Powers S, et al. (2004) G protein-coupled receptors GPR4 and TDAG8 are oncogenic and overexpressed in human cancers. *Oncogene* 23: 6299–6303.
- Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, et al. (1999) A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* 17: 163–170.
- Cui P, Tomisig JL, McCalmont WF, Lee S, Becker CJ, et al. (2007) Synthesis and biological evaluation of phosphonate derivatives as autotaxin (ATX) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 1634–1640.
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, et al. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3597–3602.
- Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, et al. (2002) Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* 277: 48737–48744.
- Gerrard JM, Robinson P (1989) Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1001: 282–285.
- Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH (1993) The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 291 (Pt 3): 677–680.
- Onyia JE, Helvering LM, Gelbert L, Wei T, Huang S, et al. (2005) Molecular profile of catabolic versus anabolic treatment regimens of parathyroid hormone (PTH) in rat bone: an analysis by DNA microarray. *J Cell Biochem* 95: 403–418.
- Marx SJ (2000) Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. *N Engl J Med* 343: 1863–1875.
- Peyruchaud O, Karin NJ (2009) Lysophosphatidic Acid: Role in Bone and Bone Cancer. In: Bronner FA-C MC, ed. *Bone and Cancer*. Farmington, CT: Springer. pp 73–88.
- Grey A, Banovic T, Naot D, Hill B, Callon K, et al. (2001) Lysophosphatidic acid is an osteoblast mitogen whose proliferative actions involve Gq proteins and protein kinase C, but not P42/44 mitogen-activated protein kinases. *Endocrinology* 142: 1098–1106.
- Masiello LM, Fotos JS, Galileo DS, Karin NJ (2006) Lysophosphatidic acid induces chemotaxis in MC3T3-E1 osteoblastic cells. *Bone* 39: 72–82.
- Karagiosis SA, Karin NJ (2007) Lysophosphatidic acid induces osteocyte dendrite outgrowth. *Biochem Biophys Res Commun* 357: 194–199.
- Gitley J, Openshaw S, Pring ET, Sale S, Mansell JP (2006) Lysophosphatidic acid cooperates with 1alpha,25(OH)2D3 in stimulating human MG63 osteoblast maturation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80: 46–61.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, et al. (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3: 537–549.
- Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, et al. (2005) Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J Clin Invest* 115: 44–55.
- Guisse TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, et al. (1996) Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98: 1544–1549.
- Hiraga T, Myoui A, Choi ME, Yoshikawa H, Yoneda T (2006) Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* 66: 2067–2073.
- Bellahcene A, Bachelier R, Detry C, Lidereau R, Clezardin P, et al. (2007) Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101: 135–148.
- Taghavi P, Verhoeven E, Jacobs JJ, Lambouij JP, Stortelers C, et al. (2008) In vitro genetic screen identifies a cooperative role for LPA signaling and c-Myc in cell transformation. *Oncogene* 27: 6806–6816.
- Murph MM, Nguyen GH, Radhakrishna H, Mills GB (2008) Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: expression in cancer and mechanisms of regulation. *Biochim Biophys Acta* 1781: 547–557.

49. Zeng Y, Kakehi Y, Nouh MA, Tsunemori H, Sugimoto M, et al. (2009) Gene expression profiles of lysophosphatidic acid-related molecules in the prostate: relevance to prostate cancer and benign hyperplasia. *Prostate* 69: 283–292.
50. Peyruchaud O, Serre CM, NicAmhlaioibh R, Fournier P, Clezardin P (2003) Angiostatin inhibits bone metastasis formation in nude mice through a direct anti-osteoclastic activity. *J Biol Chem* 278: 45826–45832.
51. Ferry G, Tellier E, Try A, Gres S, Naime I, et al. (2003) Autotaxin is released from adipocytes, catalyzes lysophosphatidic acid synthesis, and activates preadipocyte proliferation. Up-regulated expression with adipocyte differentiation and obesity. *J Biol Chem* 278: 18162–18169.
52. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, et al. (2000) Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 60: 2949–2954.

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons développé des outils génétiques qui ont permis de démontrer que le blocage de la voie de signalisation ATX/LPA réduisait le risque de métastases issues de cancer du sein. Actuellement, les études sur les inhibiteurs de la voie ATX/LPA représentent un axe de recherche thérapeutique important. Dans une étude complémentaire nous avons analysé l'effet du blocage pharmacologique d'ATX sur la formation spontanée de métastases pulmonaires. Cette étude constitue une première approche préclinique de ciblage d'ATX par de nouvelles molécules destinées à prévenir la formation des métastases de cancers du sein.

Dans ce cadre, j'ai pu évaluer l'effet d'un analogue du LPA, le VPC8a202, qui est un bloqueur de l'activité lysoPLD d'ATX [324], sur la dissémination métastatique spontanée des cellules 4T1 (figure 18). L'analyse des coupes de poumons a montré que, le VPC8a202 était capable dans un contexte immunocompétent, de diminuer la capacité métastatique des cellules 4T1. Il est intéressant de noter qu'à l'instar de l'inhibition génétique de l'expression d'ATX dans les cellules 4T1, le blocage pharmacologique de l'activité lysoPLD n'a pas d'influence sur la taille de la tumeur primaire. Ces résultats suggèrent qu'une telle approche en clinique aurait peu d'impact sur la masse tumorale mais par contre serait efficace sur la prévention de la survenue de métastases.

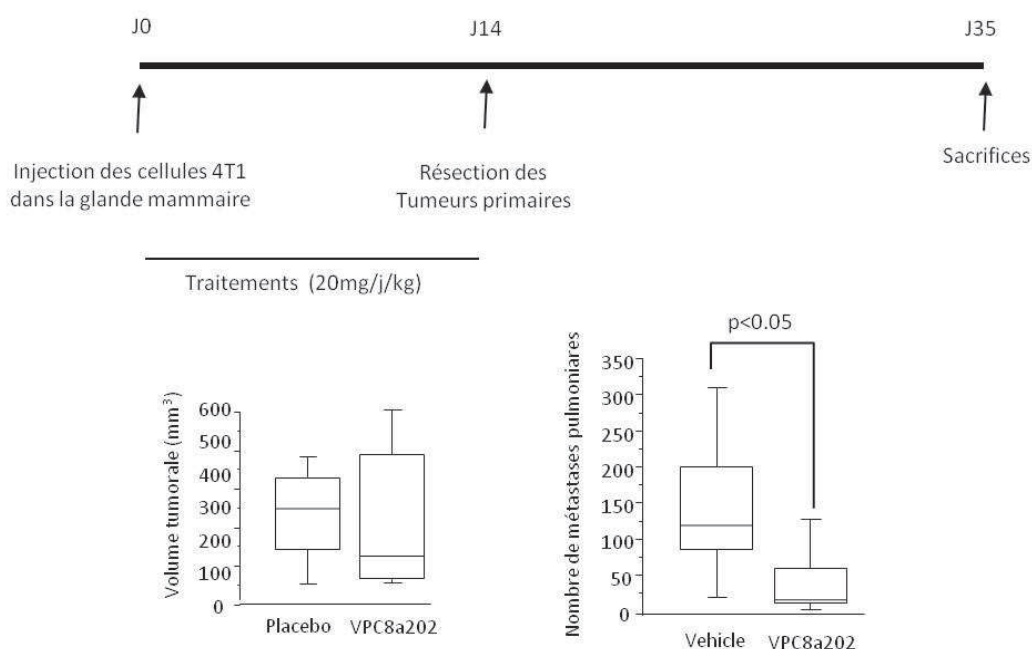


Figure 18 : Effet de l'inhibiteur de l'autotaxine VPC8a202 sur la dissémination tumorale spontanée des cellules de cancer du sein 4T1. Les cellules 4T1 ont été injectés dans la glande mammaire de souris syngéniques normales Balb/c. Les tumeurs primaires sont résectionnées au 14^{ème} jour. Les animaux sont traités avec le VPC8a202 jusqu'à la résection tumorale et sont sacrifiés et analysés 30 jours après l'injection des cellules tumorales. Les poumons sont collectés et inclus dans la paraffine. Les coupes sont colorées à l'éosine et le nombre de métastases est mesuré sous microscope. $P < 0.05$, La barre de taille représente 200 μ m.

De plus, nous avons quantifié le niveau d'expression de l'ARNm d'ATX par RT-PCR quantitative à partir d'une banque d'ADNc de tumeurs primaires de patientes atteintes de cancers du sein. Nous avons démontré que le niveau d'ATX dans les tumeurs primaires de ces patientes était un facteur indépendant de la taille et du grade des tumeurs et du statut métastatique des patientes suggérant que l'expression d'autotaxine ne soit pas un facteur prédictif de la dissémination métastatique osseuses des cancers du sein. Il est important de souligner que les cellules MDA-B02 utilisées dans cette étude, possèdent un fort tropisme osseux, or ces cellules n'expriment pas ATX. Ceci suggère qu'ATX n'est vraisemblablement pas impliquée dans le tropisme des cellules de cancer du sein au tissu osseux.

La régulation de l'expression endogène de l'autotaxine est mal comprise à l'heure actuelle et totalement inconnue dans le contexte des métastases osseuses. Les BMPs, le FGF2 et l'EGF qui peuvent être libérés de la matrice osseuse résorbée ont été décrits comme stimulant *in vitro* l'expression d'ATX dans les cellules tumorales de la thyroïde et dans des précurseurs mésenchymateux [254,325,326]. Les cellules 4T1 ont été mises en présence de facteurs connus pour être au site osseux. Après 24h de traitement, les niveaux d'expression de l'autotaxine ont été quantifiés par RT-PCR quantitative. Ceci m'a permis d'identifier trois facteurs : le basic growth factor (bFGF), l'IL-6 et le TNF- α qui induisent une augmentation de l'expression endogène de l'autotaxine *in vitro* de façon dose-dépendante (résultats non montrés). De plus, l'utilisation d'un large panel d'inhibiteurs des voies de signalisation intracellulaires (Forskoline, IbmX, PTX,...) m'a permis de déterminer que l'expression d'ATX dans les cellules de cancer du sein 4T1 pouvait être contrôlée par des voies de signalisation dépendantes de l'AMP cyclique. La présence importante au site des métastases osseuses de facteurs qui stimuleraient l'expression d'AMP cyclique suggère que l'expression d'ATX pourrait être régulée de façon particulière au site-même des métastases osseuses.

C. Travail expérimental n°2 : le récepteur de type 1 de l'acide lysophosphatidique est un facteur prédictif et une cible thérapeutique des métastases issues de cancers du sein.

1. Introduction

Une étude récente a montré que la surexpression des récepteurs LPA₁₋₃ dans la glande mammaire de souris transgéniques est suffisante pour introduire des tumeurs mammaires, démontrant l'activité oncogénique de ces récepteurs (paragraphe II-C-7-b) . La variation spécifique d'expression des récepteurs du LPA n'a pas été trouvée dans les bases de données de DNA microarray en fonction des différentes catégories de cancers du sein [312]. Nous et d'autres avons observé que l'ARN messenger de LPA₁ est exprimé de façon constante dans des tumeurs primaires du sein humaines [4,319]. Dans le modèle animal immunodéficient de formation de métastases osseuses utilisé au laboratoire, il a été montré que la surexpression du récepteur LPA₁ par les cellules tumorales entraînait une augmentation de la formation des métastases osseuses. Malgré l'accumulation de données supportant l'implication de LPA₁ dans la progression des cancers du sein et le développement métastatique, la confirmation préclinique et clinique d'une telle hypothèse n'a toujours pas été apportée.

La deuxième partie expérimentale a consisté à déterminer si les niveaux d'expression de l'ARNm de LPA₁ au niveau de la tumeur primaire présentent une valeur pronostique sur la survenue d'événements métastatiques et sur la survie des patients atteints de cancer du sein. Nous avons testé, dans un deuxième temps, l'efficacité anti-métastatique d'un agent pharmacologique, inhibiteur des récepteurs LPA_{1/3} (DEBIO-0719, Debiopharm, Lausanne, Suisse) dans notre modèle syngénique de dissémination métastatique spontanée des cellules de cancer du sein 4T1.

2. Principales observations

Dans cette étude, nous avons montré que le niveau d'expression de LPA₁ dans les tumeurs primaires des patientes non ménopausées était significativement plus important chez les patientes ayant développé des métastases ganglionnaires. Au niveau clinique, les ganglions sont souvent le premier site envahi par les cellules tumorales lors du processus métastatique. De ce fait, le niveau

d'envahissement ganglionnaire est associé à un mauvais pronostic pour les patientes. L'analyse des patientes sur une durée de 5 ans a montré que l'augmentation du niveau d'expression de LPA₁ dans la tumeur primaire était associée à l'augmentation de l'incidence de la survenue de métastases. Ces résultats suggèrent que LPA₁ serait un marqueur pronostique de l'apparition de métastases chez les patientes atteintes de cancer du sein.

Afin de confirmer cette hypothèse nous avons testé l'effet de l'inhibition précoce de LPA₁ *in vivo* sur un modèle de formation de métastases spontanées. Nos résultats indiquent que le traitement des souris avec DEBIO-0719, un inhibiteur de LPA_{1/3}, au moment de la phase précoce de la croissance tumorale inhibe la formation de métastases pulmonaires spontanées et la dissémination des cellules 4T1 dans la moelle osseuse sans affecter la croissance de la tumeur primaire. Ces résultats confèrent au DEBIO-0719 un potentiel thérapeutique prometteur dans le cadre de la prévention des événements métastatiques au cours de la progression des cancers du sein.

L'ensemble de ces résultats amène une information nouvelle sur le fait que LPA₁ serait un marqueur pronostique de la survenue de métastases chez les patientes non ménopausées ayant un cancer du sein et que l'inhibition de ce récepteur permettrait de prévenir la formation de métastases.

3. Article n°2

The lysophosphatidic acid receptor type 1 is a predictive factor and therapeutic target for metastasis in breast cancer.

Running title:

LPA₁ and breast cancer metastasis.

Article category:

Research article/Cancer cell biology

Abbreviations:

ATX, Autotaxin; DTC, Disseminated tumor cell; ER, Estrogen receptor; ErbB2/HER2, Human Epidermal growth factor Receptor 2; LPA, Lysophosphatidic acid; LPA₁₋₆, Lysophosphatidic acid receptor type 1 to 6; MEF, Mouse embryonic fibroblast; MMTV, Mouse mammary tumor virus; PgR, Progesterone receptor; RT-QPCR, Reverse transcription followed by quantitative polymerase chain reaction; shRNAi, Small hairpin RNA interference; vWF, Von Willebrand factor.

Authors' names (in order), and affiliation

Marion David^{1,2,3}, Françoise Descotes⁵, Johnny Ribeiro^{1,2,3}, Claire-Marie Serre^{1,2,3}, Isabelle Barbier⁶, Maximilien Murone⁶, Philippe Clézardin^{1,2,3} and Olivier Peyruchaud^{1,2,3}.

¹INSERM, U664, Lyon, France. ²Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. ³Faculté de Médecine Laennec, Lyon, France.. ⁵Centre Hospitalier Lyon Sud, Hospices Civils de Lyon, Pierre Bénite, France.. ⁶DebiopharmGroup, Lausanne, Switzerland.

Abstract:

Lysophosphatidic acid (LPA) is a bioactive phospholipid that stimulates cell proliferation, motility and differentiation. LPA mediates its activities due to the stimulation of a series of at least six G protein-coupled receptors (LPA₁₋₆). The respective contribution of each receptor to cancer formation, progression and/or metastasis is difficult to evaluate because of highly frequent co-expression of multiple receptors in cells. All three receptors, LPA₁, LPA₂ and LPA₃, were found to act as oncogenes and prometastatic factors in the mouse mammary gland. However, this is not well defined at the clinical level. Here we quantified the LPA₁ mRNA expression in primary tumors on a cohort of non-menopausal breast cancer patients by using reverse transcriptase quantitative-polymerase chain reaction experiments. Increase LPA₁ mRNA expression was significantly related to lymph node-positive status ($p < 0.001$). The Kaplan-Meier curves for metastasis-free survival indicated that LPA₁ mRNA value was predictive of metastasis recurrence of disease progression. The mammary 4T1 cancer cells express LPA receptors. *In vitro*, the LPA₁/LPA₃ antagonist, DEBIO-0719, inhibited LPA-dependent 4T1 cell invasion. Treatment of BALB/C mice with DEBIO-0719 inhibited spontaneous metastasis dissemination of 4T1 cells to bone and lungs without affecting the growth of orthotopic primary tumors and tumor-induced angiogenesis. Altogether, our results demonstrated that LPA₁ is an metastasis prognostic factor and that targeting this receptor has a high therapeutic potential against metastasis formation for breast cancer patients.

Key words: Breast cancer, Metastasis, Lysophosphatidic acid, LPA₁

Introduction:

Lysophosphatidic acid (LPA) is a natural bioactive phospholipid with growth factor-like activities ¹. LPA controls cell proliferation, motility and differentiation on many cell types including cancer cells. All intracellular G-protein signaling pathways are mobilized upon LPA stimulation ². This is due to the expression of multiple cell surface G protein-coupled receptors specific for LPA. At least six LPA receptors have been described as transducers of LPA activity (LPA₁₋₆) ². These receptors are widely expressed in tissues and virtually, an eukaryotic cell with no LPA receptor does not exist. Among these receptors LPA₁ has the more ubiquitous spectrum of expression in the organism ³. LPA is implicated in several physiological and pathological processes (immunological system, fertility, central nervous system, renal fibrosis, lung fibrosis, hair lost, cancer) ⁴. Accumulating data over the past ten years indicate that LPA is involved in cancer progression ⁵. The more important source of LPA in the organism comes from platelet activity upon platelet aggregation ⁶. We have shown that LPA-derived from platelet controls bone metastasis formation of breast cancer cells ⁷. LPA can also be produced by tumor cells themselves, especially those that express the nucleotide-pyrophosphate pyrophosphatase 2/Autotaxin/ATX ^{8,9}. Since its discovery as an autocrine motility factor produced by melanoma cells, ATX was shown to control the metastatic behavior of breast cancer cells ^{10,11}. LPA might also be involved in carcinogenesis since a series of studies reported that mRNA expression for LPA₂ and LPA₃ were elevated in numerous cancers, including ovarian ¹², thyroid ¹³, colorectal ¹⁴ and invasive breast ductal carcinomas ¹⁵. In the context of ovarian cancer, all three LPA receptors (LPA₁, LPA₂, LPA₃) were found to control tumorigenesis and aggressiveness of cancer cells ¹⁶. LPA₁, LPA₂ and LPA₄ but not LPA₃ were found to collaborate with c-Myc and Tbx2 to transform MEF indicating that LPA receptors are involved in tumorigenesis ¹⁷. More recently, overexpression of each LPA receptor (LPA₁, LPA₂ and LPA₃) in the mammary gland of MMTV-LPA_r transgenic mice induces tumor formation and metastasis ¹⁰. These data indicate that LPA receptors might also act as oncogenes.

We and others have observed that LPA₁ mRNA was consistently expressed in human primary breast tumors ^{7, 15}. Yet, the clinical relevance of such observations in cancer progression is not well defined. In the present study we evaluated the prognostic value of LPA₁ mRNA expression levels on the metastasis-free survival status of non menopausal breast cancer patients by using RT-QPCR on a cohort of patients. Also, by using the mouse mammary 4T1 cancer cells that mimic the clinical steps of breast cancer progression and metastasis when injected into syngenic BALB/C mice, we found that targeting LPA₁ with DEBIO-0719, inhibited spontaneous metastasis dissemination of these cells to lungs and bone without effect on primary tumor growth and tumor-induced angiogenesis. Altogether, our results demonstrated that LPA₁ promotes metastasis and that targeting this receptor has a high therapeutic potential against metastasis formation in breast cancers.

Material and Methods

Drugs and reagents. Lysophosphatidic acid (LPA, Oleoyl C18:1) were obtained from Avanti Polar Lipids. DEBIO-0719 correspond to the R-racemic purified form of the competitive inhibitor of LPA signaling pathways dependent on LPA1 and LPA3 receptors, Ki16425 ¹⁸, was produced by DebiopharmGroup.

Cell culture The mouse 4T1 breast cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection and were cultured in complete media, DMEM medium (Invitrogen), 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Perbio) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen), at 37°C in a 5% CO₂ incubator. 4T1 cells derive from a BALB/c spontaneous mammary carcinoma and are naturally resistant to 6-thioguanine ¹⁹. For disseminated 4T1 tumors cells (DTC) analysis, bone marrow cells were harvested from tibias and femurs of each animal by flushing. Cells were plated on 10cm culture dishes in presence of complete media supplemented with 6-thioguanine 10μM (Aldrich). After two weeks, resistant clones were fixed, stained and counted. The amount of rescued DTC was expressed in terms of cell clones/mm².

Patients and tumor characteristics. The cohort corresponded to 104 non-menopausal patients treated between October 1994 and October 2001 in three medical centers (Centre Hospitalier Régional Annecy, Chirurgie Oncologique Centre Hospitalier Universitaire Lyon-Sud, and Clinique Mutualiste Saint Etienne, France)²⁰. Criteria for inclusion in the study were as follow: primary breast tumor without inflammatory features, no previous treatment and no identified metastasis at the time of diagnosis. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) were assayed in cytosol using the radioligand reference method [EORTC (1980) Revision of the standards for the assessment of hormone receptors in human breast cancer; report of the second E.O.R.T.C. Workshop, held on 16-17 March, 1979, in the Netherlands Cancer Institute. *Eur J Cancer* **16**: 1513-1515]. Results were expressed as fmol/mg cytosol protein. ER and PgR positive tumors contained > 2 and > 5 fmol/mg protein respectively.

RNA extraction. For the first cohort, breast cancer tissue biopsies were obtained by surgery, selected by the pathologist and immediately snap-frozen in liquid nitrogen until processing. The biopsies were pulverized using a "Mikro-Dismembrator" (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) and total RNAs were extracted using TRI Reagent (Sigma, St Louis, MO). To remove any genomic DNA contamination, total RNAs were treated with RNase-free DNase I and purified using RNeasy micro columns (Qiagen, Hilden, Germany). RNAs quality was verified using an Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

Reverse transcription and quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-QPCR)

Expression of LPA1 mRNA was quantified by real-time quantitative RT-PCR on an Eppendorf Mastercycler® RealPlex (Invitrogen) using the SYBR® Green PCR kit (Finnzymes). Quantifications were normalized to corresponding RNA L32 and TBP values. The cDNAs were amplified by PCR for 35 cycles with the following specific PCR primers: Human LPA1, 5'-TGGCATTAAAAATTTACAAAAACA-3' (forward) and 5'-AATAGTTAACAACATGGGAATGG-3' (reverse); Human L32, 5'-

CAAGGAGCTGGAAGTGCTGC-3' (forward) and 5'-CAGCTCTTTCCACGATGGC-3' (reverse); Human TBP, 5'-TGGTGTGCACAGGAGCAAG-3' (forward) and 5'-TTCACATCACAGCTCCCCAC-3' (reverse). Each cycle consisted of 10s of denaturation at 95°C, 15s of annealing at 60°C for LPA1 and 67°C for L32 and TBP, followed by 10 s of extension at 72°C. Experimental procedures were followed as described ¹¹.

Cell Invasion assay. Invasion assays were carried out using Bio-Coat migration chambers (Becton Dickinson) with 8µm filters previously coated with Matrigel as described previously ²¹. 4T1 cells ($2 \cdot 10^5$) were plated in the upper chambers in presence or absence of increasing concentrations of DEBIO-0719 and LPA in the lower chambers in presence of 1% fetal bovine serum. After incubation for 24h at 37°C in 5% CO₂ incubator, cells that had migrated through the filters were fixed and stained. The membranes were mounted on glass slides, and cells from 10 random microscopic fields (x400 magnification) were counted. All experiments were run in duplicate, and invasion was expressed in terms of cells/mm².

Animal studies. All procedures involving animals including housing and care, method of euthanasia, and experimental protocols were conducted in accordance with a code of practice established by local ethical committee (CREEA, Lyon, France). Studies were routinely inspected by the attending veterinarian to ensure continued compliance with the proposed protocols. Tumor pad experiments were performed using 4T1 cells (10^5 in 10µl of PBS) injected into the fat pad of the 4th mammary gland of female BALB/C mice of 6 weeks of age (Charles River). Tumor weights were determined 14 days after inoculation. For spontaneous metastasis dissemination studies, 14 days after tumor cell injection, animals were anesthetized and primary tumors were surgically removed. Mice were then followed for an additional 3-week observation at which time they were sacrificed, lungs were collected for histological analysis and bone marrow cells were harvested for DTC quantification.

Immunohistochemistry. Resected primary tumors were fixed and embedded in paraffin. Five μm sections were subjected to immunohistochemistry. Detection of the nuclear antigen Ki67 was carried out as described previously ¹¹. The Ki67 mitotic index was calculated as the ratio of the number of Ki-67 positive nuclei to the total nucleus number per field and results were expressed as the percentage of Ki-67-positive nuclei. For microvessel detection, immunostaining was performed with a rabbit polyclonal antibody against von Willebrand factor (vWF), and a rat monoclonal antibody against mouse CD31 (PECAM-1). Tumor angiogenesis was evaluated using the Chalkley's Grid. Data were expressed as the percentage of marks on the grid that cover stained vessels from 10 independent fields on each tumor tissue section.

Statistical analysis. Data were analyzed with the Stat-View 5.0 software using unpaired Student's t test for in vitro and in vivo studies. The criterion for statistical of clinical analyses was the metastasis free survival, i.e. the delay between the time of primary surgery and the first event: nodal or distant metastasis, or death. Analysis of the distribution of lpa1 expression in relation to usual prognostic parameters was performed the non parametric Mann Whitney test or Kruskal-Wallis test. Survival probabilities were estimated using Kaplan Meier estimators and were compared using the log-rank test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results:

LPA₁ is predictive factor for breast cancer metastasis

LPA receptors act as oncogenes and prometastatic factors when over-expressed in the mammary gland of MMTV-LPA_r transgenic mice ¹⁰. The main sites of metastasis in MMTV-LPA_r transgenic mice are regional lymphoma nodes ¹⁰. In clinic, lymph nodes are the first sites invaded by tumor cells during the metastasis process. Therefore, a high number of positive lymph nodes contributes to the poor prognosis for patients with breast cancers ²². We investigated whether LPA₁ might be linked to lymph node invasion in breast cancer patients. We analyzed the expression levels of the mRNA for LPA₁ in a series of 104 primary tumors from non menopausal patients without metastasis at the time of diagnosis. Higher LPA₁ mRNA expression was significantly related to positive node tumors, $p < 0.001$ (Table 1). Any other classical prognostic factors (surgical tumor size, histological grade, ER and PgR status) revealed no difference (Table 1). The Kaplan Meier curves were constructed after segmentation into two groups on the basis of the LPA₁ expression cut-off, the first quartile (Fig. 1a). Follow-up analysis over a five year period revealed a significant increased incidence for recurrent metastases ($p = 0.045$) in patients with a high LPA₁ expression at the primary site compared to patients with a low level expression of LPA₁, as quantified by real-time RT-PCR (Fig. 1a). In addition, we found that only the subset of patients presented tumor with ER and/or PgR negative status and a high expression of LPA₁ mRNA had developed metastasis recurrence during the five-year follow-up (Supporting information Fig.1). This cohort of non-menopausal patients included in this study was rather small ($n = 104$) and the probability value barely reached the statistical significance. These results suggested that the levels of LPA₁ expression at the primary site of breast cancer might control metastasis dissemination. We have shown previously that LPA₁ is a potential therapeutic target for patients with bone metastases ²³. Here, our clinical data suggested that LPA₁ might also be a therapeutic target against metastasis dissemination of tumor cells to soft tissues of the progression of breast cancers.

Targeting LPA₁ in vivo with DEBIO-0719 inhibits spontaneous metastasis of 4T1 cells but not primary tumor growth and angiogenesis

To analyze the role of LPA₁ in the metastatic process, we used a preclinical mouse model that mimics the successive steps of the progression of breast cancers observed in clinic^{19, 24}. In this model, mouse 4T1 breast cancer cells are injected in the mammary fat-pad of normal BALB/C mice. Fourteen days after cell injections, primary 4T1 tumors are resected and animal are kept for an additional two week period that allows the emergence of spontaneous metastases to lungs, liver and bone. Recent studies have shown that LPA₁ is the main receptor that transduces the cell migratory activity of LPA²⁵. 4T1 cells express all subtypes of LPA receptors including LPA₁¹¹. We found previously that 4T1 cells respond to LPA as a chemattractant in cell invasion assay¹¹. We observed here that the migratory activity of LPA was dose-dependently blocked when cells were treated with increasing concentrations of the LPA₁/LPA₃ antagonist, Debio-0719, which corresponded to the R-racemic purified form of Ki16425 (Fig. 2)¹⁸.

To analyze the role of LPA₁ during the early steps of the metastatic dissemination of breast cancer cells, mice were inoculated orthotopically with 4T1 cells in the mammary gland and treated per os with DEBIO-0719 (50mg/kg/day and 100mg/kg/day) or with the vehicle only, from day 0 to day 14 post cell injection. Treatments were stopped at day 14 at which time primary tumors were resected. Animals were kept for an additional 14 day period and received no treatment until the day of sacrifice, where lungs were collected for histological examinations and bone marrow cells were harvested to rescue *in vitro* medullar 4T1 disseminated tumor cells (4T1-DTCs). Firstly, we observed that a daily treatment of animals with DEBIO-0719 was well tolerated as judged by a constant gain of weight of the mice treated with 50mg/kg or 100mg/kg as compared with mice treated with the vehicle (Supporting information Fig. 2). Second, by measuring the weight of resected tumors, we found no difference in the size of primary tumors between treated and untreated animals with DEBIO-0719 (Figs. 3a and 3b) indicating that DEBIO-0719 did not affect the growth of the tumors at the primary site. This result was rather surprising based on our previous results

showing a LPA1-dependent mitogenic activity of LPA on human MDA-MB231 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* ⁷. Thus, we checked whether DEBIO-0719 might affect the proliferation of 4T1 cells *in vivo*. We analyzed the expression level of the Ki67 nuclear antigen on primary tumor sections by Immunohistochemical analyses. We found that the Ki67 mitotic index in 4T1 tumors was not affected in animals treated or not treated with DEBIO-0719 (Figs. 3c and 3d). This result indicated that the treatment of mice with DEBIO-0719 used at 50mg/kg and 100mg/kg for 14 days had no effect on 4T1 cell proliferation *in vivo*. We then quantified the effects of DEBIO-0719 on spontaneous metastasis dissemination of 4T1 cells. Fourteen days after resection of primary tumors, lungs were collected and the number and the area of metastatic foci were quantified by histological analysis. We observed that the number of lung metastasis foci was significantly reduced (inhibition = 62%, $p=0.022$) in animals treated with the higher dose of DEBIO-0719 compared to the untreated animals or to the group of mice receiving the lower dose of DEBIO-0719 (Figs. 4a and 4b). Treatment of mice with the higher dose of DEBIO-0719 also decreased significantly the total area of lung metastases (inhibition 89%, $p=0.029$) compared to untreated animals (Fig. 4c). Animals receiving the lower doses of DEBIO-0719 presented also a reduction in the area of lung metastasis foci but the value did not reach the statistical significance ($p=0.058$) (Fig. 4c). Mouse 4T1 cells disseminate spontaneously to several organs in mouse ²⁴. We then ask to know whether the effect of DEBIO-0719 was restricted to the homing of 4T1 cells to the lungs or if its activity impaired the overall metastatic process. To address this question we analyzed the presence of 4T1-DTCs at the bone site. At the time of sacrifice, bone marrow cells were harvested and 4T1-DTCs were rescued *in vitro* due to their endogenous resistance to the cytotoxic action of the 6-Thioguanine. As shown in Figure 4d, we were not able to rescue any 4T1-DTCs from animals treated with either high or low dose of DEBIO-0719.

We then ask to know if this observation could be due to an unexpected side effect of the compound on tumor cell survival in the bone marrow. We firstly generated 4T1 tumors in the mammary fat pad of BALB/C mice and then submitted the animals to the DEBIO-0719

treatment in an adjuvant setting. Primary tumors were resected at day 14 and animals were randomized based on the size of resected tumors (Supporting information Fig.3a). Then, animals were treated or not with DEBIO-0719 (50mg/kg/day or 100mg/kg/day) for a 14 days period. At the time of sacrifice, bone marrow cells were harvested and culture *in vitro* to rescue 4T1-DTCs. We found no statistically significant difference in the number of 4T1-DTCs rescued from the bone marrow of animals treated with DEBIO-0719 compared to animals treated with the vehicle (Supporting information Fig.3b). These results indicated that the activity of DEBIO-0719 did not impair the survival of cancer cells present in the bone marrow. Altogether, the results suggested that the anti-metastatic activity of DEBIO-0719 was not restricted to a specific organ but instead affected the overall metastatic capacity of 4T1 cells. Metastasis formation is a complex and multiple step process. Angiogenesis is well known to control tumor growth and metastasis²⁶. Therefore, we analyzed the effect of DEBIO-0719 on tumor angiogenesis by quantifying the levels of immunohistochemical markers vWF, an endothelial cell secreted matrix protein, and CD31, a cell surface receptor of endothelial cells, on 4T1 primary tumor sections. As presented on Figure 5, the immunostaining of both vWF and CD31 were similar in tumors collected from animals treated and untreated with DEBIO-0719. This result indicated that DEBIO-0719 did not interfere on 4T1 breast tumor angiogenesis.

Discussion

Accumulating evidence support the hypothesis that LPA₁ is involved in breast cancer progression and metastasis but preclinical and clinical confirmations are still needed. Here, based on a longitudinal study from a cohort of non menopausal patients with breast cancers, we found that increased expression of LPA₁ at the primary tumor site was a predictive marker for metastasis recurrence. LPA₁ has a broad pattern of expression in normal tissues as opposed to other LPA receptors³. LPA₁ is consistently expressed in breast cancers as well as in many other cancers²⁷. However, as opposed to LPA₂ and/or LPA₃, increased expression of LPA₁ was not associated with the stage or grade of ovarian, thyroid, colon and breast cancers as well^{12, 13, 15}. Even more, microarray studies on primary tumors showed that LPA₁ expression was significantly decreased in ovarian cancer patients when compared to benign controls²⁷. The cellular environment may account for the biological role of LPA₁ in cancer development. *In vitro*, overexpression of LPA₁ induced apoptosis and anoikis in A2780 ovarian carcinoma and Jurkat T cells as opposed to our previous observation showing increased proliferation of human MDA-MB231 breast cancer cell line overexpressing this receptor^{7, 28}. In the context of breast cancer, expression of LPA₂ is enhanced in human ductal carcinoma cells compared with normal mammary epithelium¹⁵. This study showed additionally that the frequency of high LPA₂ expressing tumors correlated with the age and the postmenopausal status of patients but not with other clinical and pathological factors including nodal and distant metastases¹⁵. We found that high expression of LPA₁ distributed with the nodal status of non menopausal breast cancer patients suggesting that increase expression of this receptor might contribute to metastasis. Intriguingly, the analyses of a series of five breast cancer databases consisting for at least 100 patients and representing over 800 total breast cancer samples by Murph and colleagues 2004 as well as data collected from compiled studies in Oncomine (www.oncomine.org) did not revealed distinct trend in LPA₁ expression among breast tumors²⁷. Metastasis is now considered as a very early event during tumor growth²⁹. We observed that blocking LPA₁ activity during the early phase of tumor development with DEBIO-0719, which is the R-racemic purified form of the

mix LPA₁/LPA₃ antagonist Ki16425¹⁸ inhibited efficiently the formation of spontaneous bone and lung metastases in a preclinical breast cancer mouse model exploiting the 4T1 mammary carcinoma cell line.

LPA is well known to have a mitogenic activity on a wide range of normal and cancer cell types⁵. Recent reports demonstrated that LPA receptors, including LPA₁ control directly the carcinogenesis through a pro-oncogenic action. By using an ErbB2/HER2 inducible system in the non tumoral human MCF-10A breast cell line, Witt and colleagues found that LPA₁ exhibits a fully oncogene activity in proliferation, migration and 3-dimensional acinar morphogenesis assays³⁰. However, a weak signal from ErbB2/HER2 revealed necessary for LPA₁-induced cell action. An initial transformation step of MEF with c-myc and Tbx2 is also required for the oncogenic activity of LPA₁, LPA₂ and LPA₄¹⁷. However, *in vivo*, individual over-expression of LPA₁, as well as LPA₂ and LPA₃, driven by the MMTV promoter in transgenic mice leads to the formation of spontaneous mammary tumors within a year¹⁰. Interestingly, over-expression of Autotaxin (ATX), a LPA-producing enzyme, in MMTV-transgenic animals results in a similar spontaneous breast tumor formation¹⁰. This work suggested that the sensitization of the breast epithelium to LPA, by increasing either the local formation of LPA or the amount of cell surface LPA receptors, might prevail to initiate breast carcinogenesis rather than the control of carcinogenesis by a unique subtype of LPA receptor. We have previously shown that over-expression of LPA₁ in human MDA-B02 breast cancer cells enhanced tumor growth⁷ and reversely silencing LPA₁ in these cells delayed the growth of tumor xenographs²³. We also demonstrated recently that modulating the local production of LPA at the primary site of 4T1 breast tumors in animals, through stable down-regulation of ATX using a ShRNAi strategy, decreases spontaneously lung metastasis formation but has no impact on primary tumor growth¹¹. Such apparent discrepancy between the two cell lines on LPA reactivity might be due to their different species of origin or alternatively to the opposite estrogen receptor (ER) status of these two cell lines, ER- for MDA-B02 cells³¹ and ER+ for 4T1 cells²⁴. This point still remains unsolved. However, we found no effect on the growth of 4T1 mammary tumors in animal treated with DEBIO-0719.

These results suggested that targeting LPA or its receptor LPA₁ might not lead to successful inhibition of breast tumor growth in clinic. This hypothesis is supported by the absence of link between the size or grade, and the levels of LPA₁ expression among breast tumors analyzed throughout the present study.

LPA₁ is expressed in both ER- and ER+ breast cancer cells lines³². We also did not find significant difference on LPA₁ expression in ER- compared to ER+ human primary breast tumors. Interestingly, through ER α , 17 β -estradiol was shown to induce LPA₁ phosphorylation, desensitization and internalization in a non-genomic rapid fashion in human ER+ T47D breast cancer cells³³. Unfortunately, the absence of reliable anti-LPA₁ antibody for immunohistochemistry analyses impairs to confirm this observation at the clinic level. However, this suggests that estrogens might potentially negatively control LPA action at the tumor site of ER+ patients. This also suggest that under anti-estrogen treatment the activity of LPA₁ would be restored that would favor tumor cells to escape from their primary site and metastasize. As a support to this assumption, we found that the levels of LPA₁ expression in the tumors of ER and PgR+ patients did not predict metastasis recurrence. But, we observed that in the group of ER and/or PgR- tumor patients, only those having high expression of LPA₁ in their primary tumor experienced metastasis formation during the time course of the follow-up. This hypothesis obviously needs deeper investigations but suggests that an anti-LPA₁ therapy would be beneficial for ER- tumor patients with high LPA₁ expression and for ER+ tumor patients submitted to anti-estrogen treatments.

LPA receptors share many intracellular signaling pathways that control cell behavior³⁴. LPA is known to induce migration and invasion of breast cancer cells through the mobilization of LPA receptors and downstream activation of the β -arrestin/Ral signaling pathway^{35, 36}. Among LPA receptors, LPA₁ was identified as the transducer of the migration activity of LPA on neoplastic and non-neoplastic cells²⁵. However, the idea of having one LPA receptor devoted to one function is probably not realistic. In ovarian SKOV-3 cancer cells, overexpression of each LPA receptor, LPA₁, LPA₂ and LPA₃, increases their migration and invasiveness *in vitro*, and enhances metastasis *in vivo*¹⁶. Overexpression of LPA

receptors (LPA₁, LPA₂, LPA₃) individually in the mammary gland of MMTV-transgenic mice induces the formation of distant metastases in up to 45% of tumor bearing animals ¹⁰. We have shown previously that blocking LPA₁ activity using both genetically and pharmacological approaches inhibited efficiently, but not totally, the formation of breast cancer cell-mediated bone metastases ²³. However, among LPA receptors, LPA₁ might play a key role in the metastasis process of breast cancers. It was demonstrated, since its discovery as a metastasis suppressor gene ³⁷ that *Nm23-H1* down-regulates LPA₁ expression in breast cancers ³⁸. LPA₁ reintroduction in breast cancer cells expressing *Nm23-H1* was sufficient to rescue these cells from inhibited migration and to induce metastasis formation *in vivo* ^{39,40}.

Diagnosis of patients with a high risk of relapse and metastasis, and early therapeutic intervention are the main goals for clinicians in oncology. Altogether, our results suggested that the level of LPA₁ expression at the site of primary tumors predicts metastasis recurrence in breast cancer patients. Moreover, by using an immunocompetent mouse model, based on orthotopic implantation of breast cancer cells, we found that blocking LPA₁ activity *in vivo* with DEBIO-0719 during the phase of tumor growth inhibited efficiently bone and lung metastasis formation. Altogether, these results suggest that LPA₁ is a new metastasis prognostic factor and that targeting this receptor has a high therapeutic potential against metastasis formation for breast cancer patients.

Acknowledgment

This study was supported by grants from the INSERM (O.P. and P.C.), the Comité Départemental de la Loire de la Ligue Nationale contre le Cancer (O.P.) and the French Association pour la Recherche sur le Cancer, ARC (OP). (M.D.) was a recipient of fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer and the French Association pour la Recherche sur le Cancer, ARC.

References

1. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, Mutoh T, Lin ME, Teo ST, Park KE, Mosley AN, Chun J. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:157-86.
2. Ishii S, Noguchi K, Yanagida K. Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2009.
3. An S, Bleu T, Hallmark OG, Goetzl EJ. Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 1998;273:7906-10.
4. Lin ME, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: signaling properties and disease relevance. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2010;91:130-8.
5. Mills GB, Moolenaar WH. The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:582-91.
6. Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 1993;291:677-80.
7. Boucharaba A, Serre C-M, Gres S, Saulnier-Blache JS, Bordet J-C, Guglielmi J, Clezardin P, Peyruchaud O. Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J. Clin. Invest.* 2004;114:1714-25.
8. Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA. Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 1992;267:2524-9.

9. Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H. Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 2002;158:227-33.
10. Liu S, Umezū-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, Zhang F, Yu S, Stephens LC, Cui X, Murrow G, Coombes K, Muller W, et al. Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* 2009;15:539-50.
11. David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Gres S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, et al. Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS ONE* 2010;5:e9741.
12. Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, Hasegawa Y, Tanyi JL, LaPushin R, Eder A, Jaffe R, Erickson J, et al. Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* 2002;1582:257-64.
13. Schulte KM, Beyer A, Kohrer K, Oberhauser S, Roher HD. Lysophosphatidic acid, a novel lipid growth factor for human thyroid cells: over-expression of the high-affinity receptor *edg4* in differentiated thyroid cancer. *Int J Cancer* 2001;92:249-56.
14. Shida D, Watanabe T, Aoki J, Hama K, Kitayama J, Sonoda H, Kishi Y, Yamaguchi H, Sasaki S, Sako A, Konishi T, Arai H, et al. Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Lab Invest* 2004;84:1352-62.
15. Kitayama J, Shida D, Sako A, Ishikawa M, Hama K, Aoki J, Arai H, Nagawa H. Over-expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res* 2004;6:R640-6.
16. Yu S, Murph MM, Lu Y, Liu S, Hall HS, Liu J, Stephens C, Fang X, Mills GB. Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1630-42.

17. Taghavi P, Verhoeven E, Jacobs JJ, Lambooij JP, Stortelers C, Tanger E, Moolenaar WH, van Lohuizen M. In vitro genetic screen identifies a cooperative role for LPA signaling and c-Myc in cell transformation. *Oncogene* 2008;27:6806-16.
18. Ohta H, Sato K, Murata N, Damirin A, Malchinkhuu E, Kon J, Kimura T, Tobo M, Yamazaki Y, Watanabe T, Yagi M, Sato M, et al. Ki16425, a subtype-selective antagonist for EDG-family lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 2003;64:994-1005.
19. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res* 1992;52:1399-405.
20. Berthier A, Seguin S, Saso AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, Saez S, Rodriguez-Lafrasse C, Tolle F, Fraichard A, Boyer-Guittaut M, Jouvenot M, et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2010;102:1024-31.
21. Boissier S, Ferreras M, Peyruchaud O, Magnetto S, Ebetino FH, Colombel M, Delmas P, Delaisse JM, Clezardin P. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. *Cancer Res* 2000;60:2949-54.
22. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin* 1997;47:28-51.
23. Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, Peyruchaud O. The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:9643-8.
24. Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller FR, Slavin J, Anderson RL. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clinical and Experimental Metastasis* 1999;17:163-70.
25. Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R, Ohta H, Yamori T, Watanabe M, Chun J, Arai H. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem* 2004;279:17634-9.

26. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967-74.
27. Murph MM, Nguyen GH, Radhakrishna H, Mills GB. Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: expression in cancer and mechanisms of regulation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1781:547-57.
28. Furui T, LaPushin R, Mao M, Khan H, Watt SR, Watt MA, Lu Y, Fang X, Tsutsui S, Siddik ZH, Bast RC, Mills GB. Overexpression of *edg-2/vzg-1* induces apoptosis and anoikis in ovarian cancer cells in a lysophosphatidic acid-independent manner. *Clin Cancer Res* 1999;5:4308-18.
29. Eyles J, Puaux AL, Wang X, Toh B, Prakash C, Hong M, Tan TG, Zheng L, Ong LC, Jin Y, Kato M, Prevost-Blondel A, et al. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J Clin Invest* 2010;120:2030-9.
30. Witt AE, Hines LM, Collins NL, Hu Y, Gunawardane RN, Moreira D, Raphael J, Jepson D, Koundinya M, Rolfs A, Taron B, Isakoff SJ, et al. Functional proteomics approach to investigate the biological activities of cDNAs implicated in breast cancer. *J Proteome Res* 2006;5:599-610.
31. Bellahcene A, Bachelier R, Detry C, Lidereau R, Clezardin P, Castronovo V. Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2007;101:135-48.
32. Goetzl EJ, Dolezalova H, Kong Y, Zeng L. Dual mechanisms for lysophospholipid induction of proliferation of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1999;59:4732-7.
33. Gonzalez-Arenas A, Avendano-Vazquez SE, Cabrera-Wrooman A, Tapia-Carrillo D, Larrea F, Garcia-Becerra R, Garcia-Sainz JA. Regulation of LPA receptor function by estrogens. *Biochim Biophys Acta* 2008;1783:253-62.
34. Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:15-23.

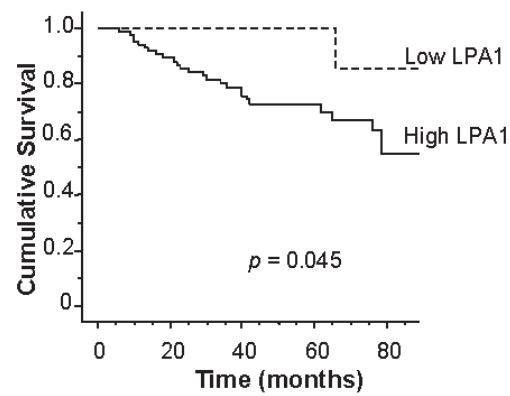
35. Boucharaba A, Guillet B, Menea F, Hneino M, van Wijnen AJ, Clezardin P, Peyruchaud O. Bioactive lipids lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate mediate breast cancer cell biological functions through distinct mechanisms. *Oncol Res* 2009;18:173-84.
36. Li TT, Alemayehu M, Aziziye A, Pape C, Pampillo M, Postovit LM, Mills GB, Babwah AV, Bhattacharya M. Beta-arrestin/Ral signaling regulates lysophosphatidic acid-mediated migration and invasion of human breast tumor cells. *Mol Cancer Res* 2009;7:1064-77.
37. Steeg PS, Bevilacqua G, Pozzatti R, Liotta LA, Sobel ME. Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res* 1988;48:6550-4.
38. Steeg PS, Horak CE, Miller KD. Clinical-translational approaches to the Nm23-H1 metastasis suppressor. *Clin Cancer Res* 2008;14:5006-12.
39. Horak CE, Lee JH, Elkahoul AG, Boissan M, Dumont S, Maga TK, Arnaud-Dabernat S, Palmieri D, Stetler-Stevenson WG, Lacombe ML, Meltzer PS, Steeg PS. Nm23-H1 suppresses tumor cell motility by down-regulating the lysophosphatidic acid receptor EDG2. *Cancer Res* 2007;67:7238-46.
40. Horak CE, Mendoza A, Vega-Valle E, Albaugh M, Graff-Cherry C, McDermott WG, Hua E, Merino MJ, Steinberg SM, Khanna C, Steeg PS. Nm23-H1 suppresses metastasis by inhibiting expression of the lysophosphatidic acid receptor EDG2. *Cancer Res* 2007;67:11751-9.

Table 1: Distribution of LPA₁ expression in different subsets of cases defined by the usual prognostic factors.

		n	Median	P value
Surgical tumor size	<20mm	37	5.19	0.607
	>=20mm	64	5.51	
Histological type	Ductal	89	5.46	0.793
	Lobular	12	5.00	
Histological grade*	GI	12	5.36	0.960
	GII	43	5.46	
	GIII	29	5.00	
Node status	neg	47	3.24	<0.001
	pos	57	6.68	
ER status	neg	27	5.46	0.556
	pos	77	5.37	
PgR status	neg	23	5.55	0.935
	pos	81	5.25	
ER and/or PgR	neg	34	5.56	0.584
ER and PgR	pos	70	5.04	

* Histological grade defined only in ductal carcinoma

P values correspond to Mann & Whitney test or Kruskal Wallis test (histological grade)



Number of events

Low LPA1	-	0	0	0	1
High LPA1	-	9	19	21	26

Number at risk

Low LPA1	19	16	15	9	1
High LPA1	85	73	51	30	13

Figure. 1: Kaplan-Meier curves for metastasis free survival probabilities in non menopausal breast cancer patients according to LPA₁ mRNA expression categorized with quartiles (n = 104, Low: ≤ 25 % quartile; High: > 25 % quartile)

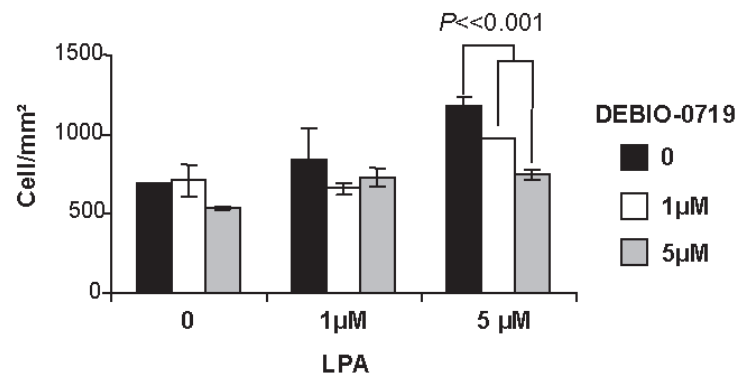


Figure. 2: Stimulation of 4T1 cell invasion by LPA through a $\text{LPA}_1/\text{LPA}_3$ receptor-dependent pathway. Cell invasion was stimulated with increased LPA concentrations used as chemoattractant in presence of increasing concentrations of DEBIO-0719 placed in the upper chamber. Results are the mean $\pm$ SD of cells of 3 replicates and are representative of at least 3 independent experiments. Data are expressed as the number of cells/ mm^2 .

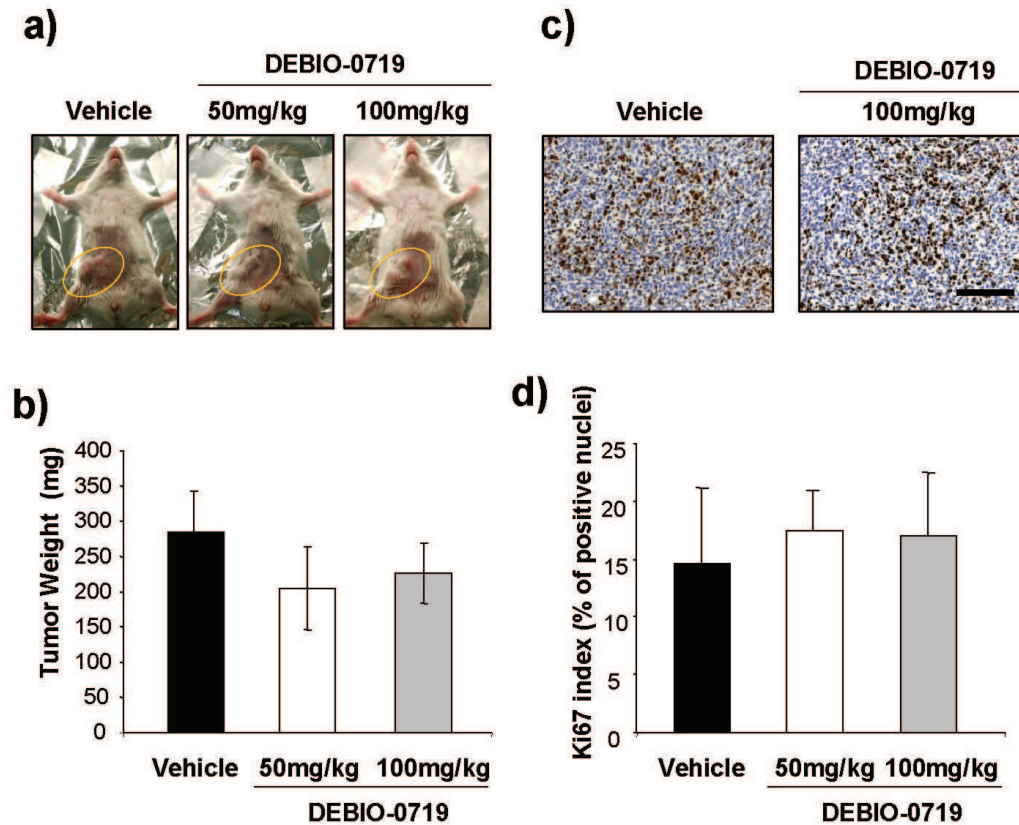


Figure. 3: Effect of DEBIO-0719 treatment on 4T1 primary tumor growth. 4T1 cells were injected in the mammary gland of normal syngenic female BALB/C mice. (a and b). Animals were treated *per os* with indicated doses of DEBIO-0719 from day 0 to day 14. At day 14, primary tumors (a) (yellow circles) were resected and weighed (b) (results are expressed in mg as the mean $\pm$ SD). Primary tumors were embedded in paraffin. (c and d) Tumor tissue sections were analysed by immunohistochemistry using a specific antibody directed against the nuclear ki-67 antigen. (d) The mitotic index was calculated as the percentage of nuclei positive for ki-67. Results are the mean $\pm$ SD, scale bar : 150 μ m.

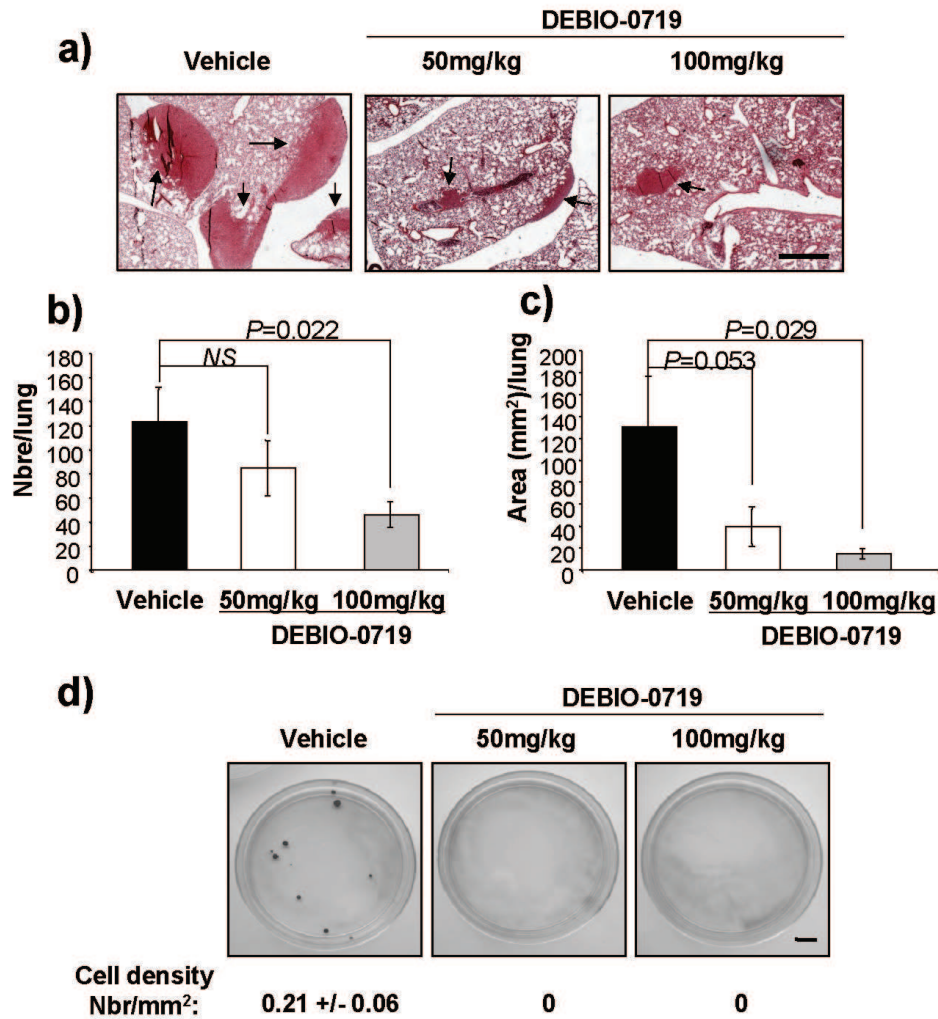


Figure. 4: Effect of DEBIO-0719 treatment on spontaneously metastasis dissemination of 4T1 cells to lungs (a, b and c) and bone (d). 4T1 cells were injected in the mammary gland of normal syngenic female BALB/C mice. Animals were treated *per os* with indicated doses of DEBIO-0719 from day 0 until day 14. At day 14, primary tumors were resected. Animals were sacrificed 35 days after tumor cell injection and lungs (a) and bone marrow cells (d) were collected to quantify metastasis spreading of 4T1 cells. (a) Lung tissue sections stained with eosin. Arrows indicated metastatic foci. Scale bar: 200µm Quantification of the number (b) and the area (c) of lung metastasis foci were enumerated under microscope. Data were expressed as total number of foci/lung (b) and total foci area(in mm²)/lung (c) (means ± SD). (d) Bone marrow cells were harvested and plated on 10cm culture dishes, in the presence of 6-thioguanine to rescue only 4T1-DTCs. 4T1-DTC clones were stained and counted. Data were expressed as the mean of cell density (in mm²) ± SD, scal bar: 1cm

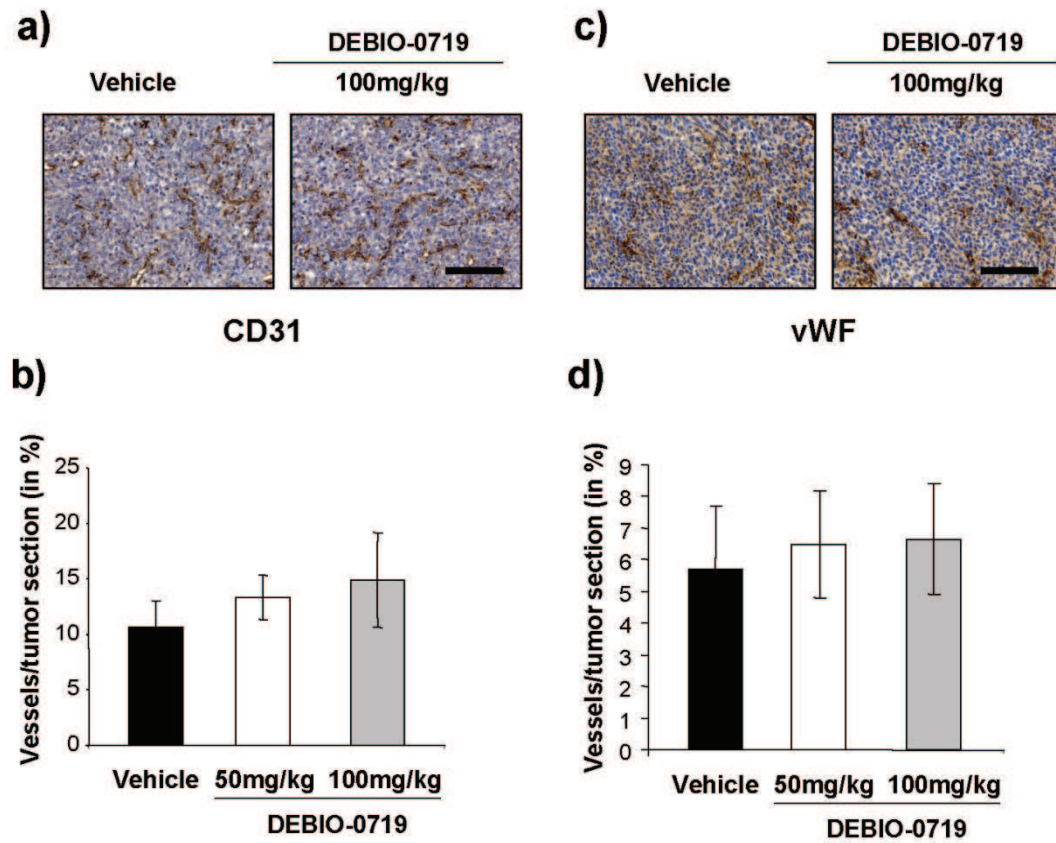
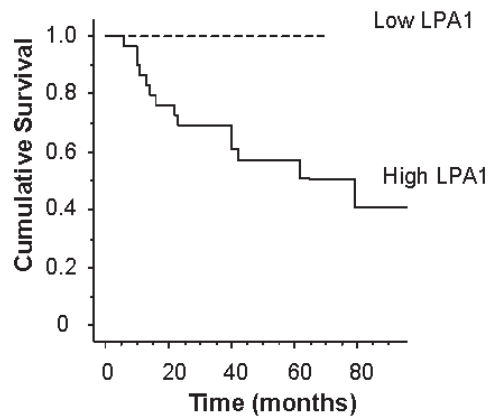


Figure. 5: Effect of DEBIO-0719 treatment on 4T1 tumor angiogenesis. Primary 4T1 tumors were collected as described in Fig.3. Tumor tissue sections were analysed by immunohistochemistry using a specific antibody directed against CD31 (a and b) and vWF (c and d). The vessel density (in % of tissue section) was calculated using the Chalkley's Grid. Results are the mean $\pm$ SD, scale bar : 150 μ m.

a)

ER and/or PgR negative subset (n = 34)
Log rank test, p = NA

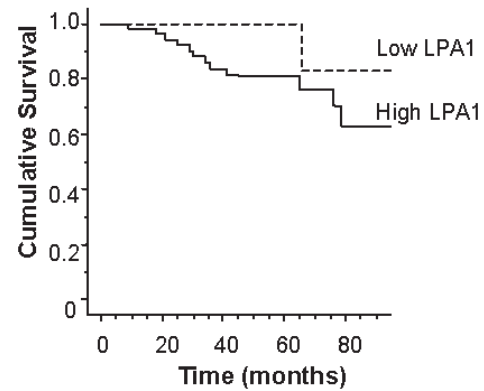


Number of events					
Low LPA1	-	0	0	0	14
High LPA1	-	7	10	12	14

Number at risk					
Low LPA1	4	4	4	2	0
High LPA1	30	22	16	10	4

b)

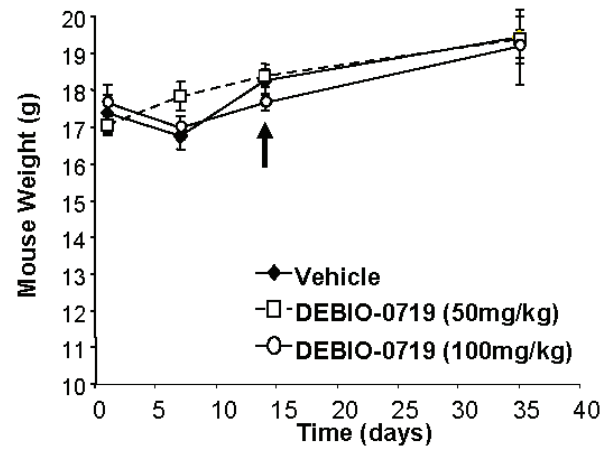
ER and PgR positive subset (n = 70)
Log rank test, p = 0.245



Number of events					
Low LPA1	-	0	0	0	1
High LPA1	-	2	8	9	12

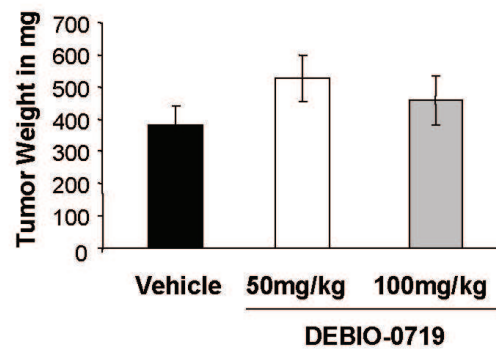
Number at risk					
Low LPA1	15	12	11	7	1
High LPA1	55	51	36	20	9

Supporting information Figure. 1: Kaplan-Meier curves for metastasis free survival probabilities in non menopausal breast cancer patients according to LPA₁ mRNA expression categorized with quartiles from ER and/or PgR negative subset (a) and ER and PgR positive subset (b). Low: ≤ 25 % quartile; High: > 25 % quartile

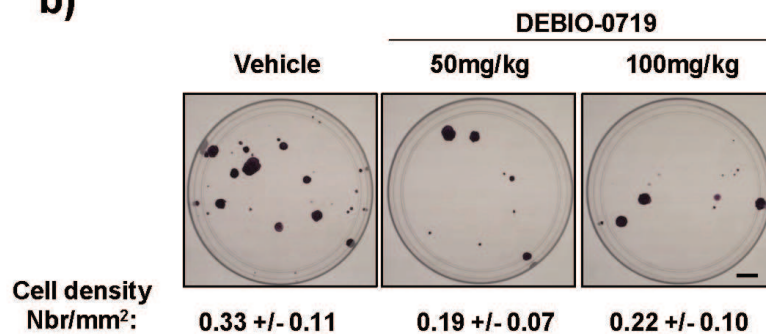


Supporting information Figure. 2: Weight of 4T1-tumor bearing animals treated daily with DEBIO-0719. Mice were inoculated with 4T1 cells by orthotopic injection into the mammary fat pad. Treatment with indicated doses of DEBIO-0719 started at day 0 and ended at day 15 post cell injection. Mouse weight was check at day 1, day 7, day 14, and day 35. Arrow indicated the time of primary tumor resections.

a)



b)



Supporting information Figure. 3: Effect of DEBIO-0719 treatment on disseminated 4T1 tumor cell survival in bone. 4T1 cells were injected in the mammary gland of normal syngenic female BALB/C mice. (a) At day 14, primary tumors were resected and animals were randomized according to the tumor size. (b) Animals were treated *per os* with indicated doses of DEBIO-0719 from day 15 until day 35. Animals were sacrificed 35 days after tumor cell injection and bone marrow cells were collected and plated on 10cm culture dishes, in the presence of 6-thioguanine to rescue only 4T1-DTCs. 4T1-DTC clones were stained and counted. Data were expressed as the mean of cell density (in mm²) ± SD, scal bar: 1cm.

4. Discussion

NM23-H1 (non metastatic clone 23) a été découvert comme gène suppresseur de métastases dans une lignée de mélanome de souris [327,328]. Une perte de l'expression de NM23-H1 aux stades avancés de certains types de tumeurs comme les mélanomes, les tumeurs du sein, du côlon et des ovaires, et les carcinomes hépatocellulaires, est inversement corrélée à leur potentiel métastatique. Globalement, la fonction exacte de NM23-H1 dans le processus métastatique reste mal définie. Récemment, l'analyse transcriptomique comparative de lignées de carcinomes surexprimant ou non NM23-H1 a permis d'identifier une série de gènes dont l'expression est modulée par NM23-H1. LPA₁ appartient au groupe de gènes le plus inhibés par NM23-H1[329]. De façon intéressante, la seule réintroduction de LPA₁ des cellules de cancer du sein exprimant NM23-H1 est suffisante pour restaurer la capacité de ces cellules à induire la formation de métastases *in vivo* [314]. Ces résultats renforcent la notion que parmi la vaste liste des récepteurs du LPA, LPA₁ jouerait un rôle clé dans le processus métastatique.

En accord avec les données relativement anciennes de la littérature sur l'absence de corrélation entre l'expression de LPA₁ et le statut oestrogénique de lignées cellulaires de cancers du sein [330], notre étude clinique ne montre aucune corrélation entre le statut ER+/ER- des tumeurs primaires de patientes ayant un cancer du sein. Cependant, les patientes présentant un profil tumoral ER- et PGR- associé à une forte expression de LPA₁ ont une incidence métastatique plus importante que toutes les autres patientes. De façon intéressante, il a été montré que le 17 β -œstradiol via ER α était capable d'induire la désensibilisation (hétérodésensibilisation) de LPA₁ dans les cellules ER+ de cancer du sein T47D [317]. Cela suggère que les œstrogènes soient potentiellement capables de réguler l'activité de LPA₁. La démonstration *in vivo* d'une telle hypothèse est assez délicate à l'heure actuelle. En effet, cela impose d'analyser l'expression de LPA₁ non pas au niveau de l'ARNm mais de la protéine à partir de coupes de tumeurs du sein ER+ et ER-. Le principe est simple, cependant il n'existe pas à l'heure actuelle d'anticorps reconnaissant LPA₁ suffisamment fiable pour mener une telle étude. D'autre part le blocage des signaux oestrogéniques par thérapie antihormonale (Tamoxifène, Raloxifène) est très utilisé dans les traitements actuels des cancers du sein ER+. Néanmoins, des phénomènes de résistance sont observés dans 40% des cas. Il est tentant d'émettre l'hypothèse que dans la logique d'une régulation négative de l'action du LPA au site primaire par les œstrogènes chez les patients ER+, les traitements anti-oestrogéniques pourraient en quelque sorte restaurer l'activité de LPA₁ et favoriser l'échappement des cellules du site primaire et la formation de métastases.

Dans ce cas, il serait extrêmement intéressant d'étudier l'effet d'une bithérapie combinant un anti-œstrogène (type Raloxifène) et un antagoniste du récepteur LPA₁ (type DEBIO-0719) sur la dissémination métastatique spontanée des cellules murines de cancer du sein ER+ 4T1 chez l'animal.

PARTIE IV : DISCUSSION GENERALE - PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont permis de montrer que l'autotaxine produite par les cellules de cancer du sein stimule la formation des métastases osseuses et pulmonaires chez l'animal. Notre étude a également permis de démontrer pour la première fois que le LPA est capable d'agir directement sur l'activité ostéoclastique en stimulant l'ostéoclastogenèse. Enfin au cours de ce travail de thèse, nous avons mis en évidence l'implication de LPA₁ en tant que facteur pronostique sur la survenue de métastases chez les patientes atteintes de cancer du sein. Les perspectives de ce travail pourraient être orientées suivant deux axes d'études :

1. Analyses précliniques

Sur la base de nos résultats, il est possible d'étudier l'action d'inhibiteurs d'ATX et des récepteurs du LPA sur la dissémination métastatique spontanée des cellules de cancer du sein et sur la formation de métastases osseuses. Ces études seront menées dans le cadre de collaborations avec différentes sociétés pharmaceutiques.

2. Analyses des mécanismes d'action d'ATX dans le cancer du sein

Il a été récemment montré qu'ATX produite au niveau des organes lymphoïdes secondaires induit le recrutement spécifique des lymphocytes T CD4⁺ CD8⁻ selon un mécanisme dépendant de l'interaction d'ATX avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ [331]. L'échappement des tumeurs à la surveillance du système immunitaire est une étape majeure de la progression tumorale. L'infiltration de cellules dendritiques de type plasmacytoïde (pDC) ou des lymphocytes T régulateurs (Treg) dans les tumeurs primaires du sein chez l'homme est un facteur de mauvais pronostic pour la survie des patients [332,333].

A partir des différentes lignées cellulaires établies au cours de notre étude, nous avons réalisé une première approche sur l'étude de l'expression d'ATX sur l'infiltration des différents types de cellules immunitaires dans le cancer du sein (en collaboration avec le Dr. Bendriss-Vermare INSERM U.590, Lyon). Pour cela nous avons généré des tumeurs primaires dans la glande mammaire de souris BALB/C, après injection des cellules 4T1, 4T1-shATX, 4T1-scrATX. Dans chaque cas, les tumeurs primaires ont été collectées deux semaines après inoculation des cellules tumorales. L'ensemble des cellules a ensuite été dispersé par traitement à la collagénase et analysé par cytométrie de flux afin

d'identifier les différents types cellulaires présents, grâce à l'utilisation des marqueurs indiqués dans le tableau ci-dessous :

Marqueurs	Types cellulaires
CD4+	Lymphocytes Helpers (LTh)
CD8+	Lymphocytes Cytotoxiques (CTL)
CD4+, CD25+, CD45RB-	Lymphocytes T régulateurs (LTreg)
CD45+, CD11b+, GR1+	Macrophages
CD45+, CD11b+, CD11c+	Cellules dendritiques myéloïdes (mDC)
CD11c+,B220+, CD11b-	Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)
CD11c+,mPDCA1+, CD11b-	Cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC)

Tableau 6 : Marqueurs des cellules immunitaires.

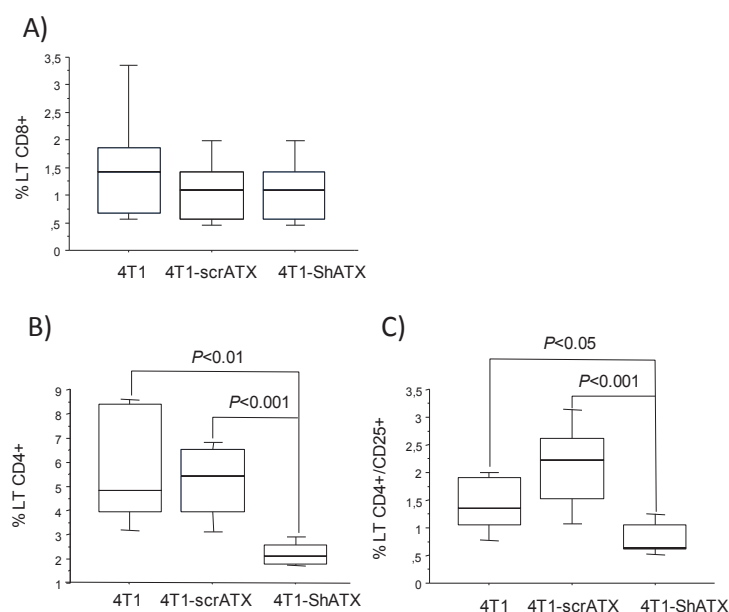


Figure 19 : Effet de l'inhibition de l'expression de l'autotaxine sur l'envahissement tumoral des cellules immunitaires. Quatorze jours après inoculation des cellules tumorales, les tumeurs primaires ont été réséquées. L'ensemble des cellules a été dispersé et analysé par cytométrie de flux à l'aide des anticorps anti-CD8+ (A), anti-CD4+ (B) et antiCD4+/antiCD25+ (Treg) (C). On note que l'inhibition d'expression d'ATX n'affecte pas l'envahissement tumoral par les lymphocytes cytotoxiques CD8+. Par contre, elle induit une réduction significative du taux de présence des lymphocytes T helpers (CD4+) confirmé par une diminution des lymphocytes régulateur (CD4+/CD25+).

Nous avons observé que l'infiltrat immunitaire de tumeurs de cellules 4T1 chez la souris BALB/C, était composé d'un nombre important de macrophages et de cellules dendritiques de type myéloïde

ayant une fonction suppressive et inhibitrice de la sécrétion d'IL-12, respectivement. L'inhibition de l'expression d'ATX chez les cellules 4T1-shATX, n'interfère pas sur l'infiltration des tumeurs primaires par les macrophages, les mDC et les pDC (résultats non montrés). De même, le taux d'infiltration par les cellules CD8⁺ restait inchangé quel que soit le niveau d'expression d'ATX par les cellules tumorales. Par contre, nous avons observé une baisse significative de l'ordre de 60% de l'infiltration des lymphocytes T CD4⁺ et du même ordre de grandeur pour les CD4⁺/CD25⁺ (Treg), spécifiquement dans les tumeurs induites par les cellules 4T1-ShATX par rapport aux tumeurs induites par les cellules parentales 4T1 et contrôle 4T1scrATX (figure 19). Ceci suggère qu'ATX participerait au contrôle du recrutement des lymphocytes T de type CD4⁺ dans les tumeurs 4T1.

A l'instar des observations effectuées dans les organes lymphoïdes secondaires, nos observations préliminaires suggèrent qu'ATX produite par les cellules tumorales pourrait potentiellement interagir également avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ pour induire l'envahissement des tumeurs par les lymphocytes T CD4⁺CD8⁻ contribuant à la progression tumorale, la dissémination métastatique et à la formation des métastases osseuses.

Les observations issues de ce travail permettent de poser de nouvelles questions qui devront être abordées dans le futur. Est-ce que l'infiltration des lymphocytes T CD4⁺ est une cause, une conséquence ou une simple corrélation de la chute des capacités métastatiques des cellules 4T1-shATX ? Est-ce que le rôle d'ATX sur la migration des lymphocytes CD4⁺ dans les tumeurs de cancer du sein est similaire à celui décrit récemment dans les organes lymphoïdes secondaires ? Quels sont les domaines d'ATX impliqués dans la migration intra-tumorale des lymphocytes CD4⁺ ?

De plus, Kanda et al ont émis l'hypothèse que, l'interaction d'ATX avec $\alpha 4\beta 1$ permettrait la production de LPA localisée à proximité des récepteurs membranaires du LPA [331]. C'est cette proximité entre le LPA et ses récepteurs qui serait essentielle. En effet, le LPA possède un groupement phosphate indispensable à son activité. Or, les phosphatases présentes en grande quantité dans les liquides biologiques sont capables de déphosphoryler et donc d'inactiver le LPA par sa transformation en MAG. A partir de l'analyse de la séquence primaire d'ATX, il est possible d'identifier plusieurs motifs de fixation potentiels des intégrines, incluant une séquence Arg-Gly-Asp (RGD) permettant la fixation des intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu \beta 3$ et $\alpha \nu \beta 5$ et une séquence Leu-Asp-Val (LDV) pour la liaison avec l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (figure 20). De nombreuses études dont celles menées dans notre laboratoire ont démontré l'importance des intégrines dans le processus de métastatique, et tout particulièrement de l'intégrine $\alpha \nu \beta 3$ dans la formation des métastases osseuses [50,52].

L'hypothèse que l'on peut formuler est qu'ATX sécrétée par les cellules tumorales ou présente dans l'environnement tumoral, interagirait via le motif RGD avec les intégrines de la famille $\beta 3$ des cellules tumorales et des plaquettes sanguines, favorisant ainsi la production de LPA et la progression des métastases osseuses.

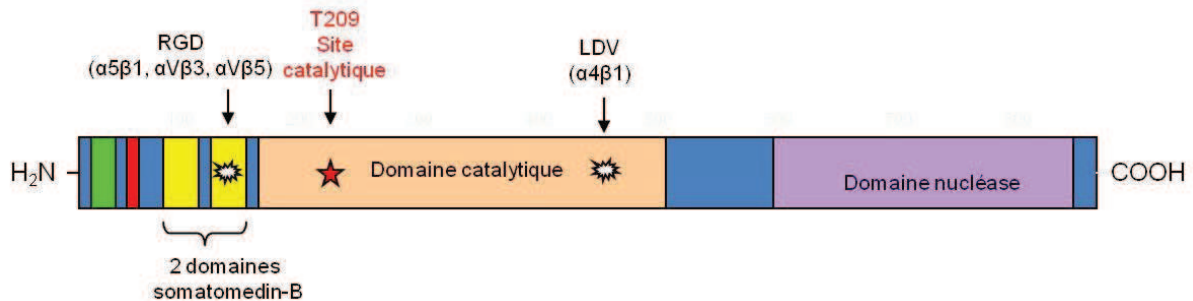


Figure 20 : Représentation schématique de l'autotaxine contenant les deux domaines de fixation aux intégrines RGD et LDV.

A l'aide des modèles cellulaires dont nous disposons au laboratoire [50,52], il sera possible de répondre aux questions suivantes : 1) Est-ce que l'autotaxine est capable de se fixer à l'intégrine $\alpha v \beta 3$ exprimée par les cellules tumorales ? 2) Est-ce que cette fixation est dépendante du motif RGD ? 3) Est-ce que le potentiel pro-métastatique de l'autotaxine serait modulé en fonction du taux d'expression de cette intégrine par les cellules tumorales ?

L'ensemble de ces études va permettre de mieux comprendre le rôle de l'autotaxine en cancérologie, et grâce à des approches précliniques de caractériser le potentiel thérapeutique du ciblage de l'autotaxine dans la prévention de la dissémination métastatique et de la progression des métastases osseuses de cancers du sein.

PARTIE V : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

A. Liste des publications

1 - David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Grès S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clézardin P, Peyruchaud O. Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS One*. 2010 Mar 17;5(3):e9741.

2 - David M, Descotes F, Ribeiro J, Serre CM, Barbier I, Murone M, , Clézardin P, Peyruchaud O. The lysophosphatidic acid receptor type 1 is a predictive factor and therapeutic target for metastasis in breast cancer. (en soumission)

B. Liste des communications à des congrès scientifiques

Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes (CLARA), Lyon FRANCE (mars 2008). *M. David, B. Deux, CM. Serre, N. Bendriss-Vermare, C. Caux, J.S. Saulnier-Blache, P. Clézardin and O. Peyruchaud* : « L'autotaxine contrôle la progression métastatique des cellules de cancer du sein ».

American Association for Cancer Research (AACR) annual meeting, San Diego USA (avril 2008). *M. David, B. Deux, CM. Serre, N. Bendriss-Vermare, C. Caux, J.S. Saulnier-Blache, P. Clézardin and O. Peyruchaud*: « Autotaxin controls breast cancer growth and metastasis in preclinical mouse models ».

Travel award : VII International Meeting on Cancer Induced Bone Disease (CABS), Edinburgh UK (juin 2008) : *M. David, B. Deux, CM. Serre, N. Bendriss-Vermare, C. Caux, J.S. Saulnier- Blache, P. Clézardin and O. Peyruchaud* , « Autotaxin promotes metastasis dissemination of breast cancer cells».

International Bone and Mineral Society (IBMS), Davos SUISSE (mars 2010). *M David, E Wannecq, S Jansen, B Deux, J Ribeiro, CM Serre, S Grès, N Bendriss-Vermare, M Bollen, JS Saulnier-Blache, P Clézardin and O Peyruchaud*. "Expression of lysophospholipase D/autotaxin by breast cancer cells controls bone metastasis formation by increasing osteoclast differentiation".

American Association for Cancer Research (AACR) annual meeting, Washington USA (avril 2010). *M David, E Wannecq, S Jansen, B Deux, J Ribeiro, CM Serre, S Grès, N Bendriss-Vermare, M Bollen, JS Saulnier-Blache, P Clézardin and O Peyruchaud*. "Autotaxin/Enpp2 controls bone metastasis formation through osteoclast function".

International Meeting on Cancer Induced Bone Disease (CABS), Sheffield UK (poster, novembre 2010) : M. David, R. Leblanc, B. Deux, CM. Serre, J. Ribeiro, P. Clézardin and O. Peyruchaud. "Interaction of Autotaxin with breast cancer cell integrins might contribute to lysophosphatidic acid-mediated bone metastases".

PARTIE VI : REFERENCES

1. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2: 563-572.
2. Body JJ (1992) Metastatic bone disease: clinical and therapeutic aspects. *Bone* 13 Suppl 1: S57-62.
3. Guise TA, Mundy GR (1998) Cancer and bone. *Endocr Rev* 19: 18-54.
4. Boucharaba A, Serre CM, Gres S, Saulnier-Blache JS, Bordet JC, et al. (2004) Platelet-derived lysophosphatidic acid supports the progression of osteolytic bone metastases in breast cancer. *J Clin Invest* 114: 1714-1725.
5. Boucharaba A, Serre CM, Guglielmi J, Bordet JC, Clezardin P, et al. (2006) The type 1 lysophosphatidic acid receptor is a target for therapy in bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9643-9648.
6. Taichman RS (2005) Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood* 105: 2631-2639.
7. Ruoslahti E (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 697-715.
8. Baron R, Neff L, Tran Van P, Nefussi JR, Vignery A (1986) Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* 122: 363-378.
9. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, et al. (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1566-1571.
10. Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, et al. (1999) RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 13: 2412-2424.
11. Van Wesenbeeck L, Odgren PR, MacKay CA, D'Angelo M, Safadi FF, et al. (2002) The osteopetrotic mutation toothless (tl) is a loss-of-function frameshift mutation in the rat *Csf1* gene: Evidence of a crucial role for CSF-1 in osteoclastogenesis and endochondral ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14303-14308.
12. Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N (2009) Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19: 61-72.
13. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-319.
14. Ross FP, Teitelbaum SL (2005) α v β 3 and macrophage colony-stimulating factor: partners in osteoclast biology. *Immunol Rev* 208: 88-105.
15. Ilvesaro J, Metsikko K, Vaananen K, Tuukkanen J (1999) Polarity of osteoblasts and osteoblast-like UMR-108 cells. *J Bone Miner Res* 14: 1338-1344.
16. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
17. Ducy P (2000) *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219: 461-471.
18. Lee KS, Hong SH, Bae SC (2002) Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene* 21: 7156-7163.
19. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, et al. (2002) The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 108: 17-29.
20. Di Benedetto A, Watkins M, Grimston S, Salazar V, Donsante C, et al. (2010) N-cadherin and cadherin 11 modulate postnatal bone growth and osteoblast differentiation by distinct mechanisms. *J Cell Sci*.
21. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Wagner EF (1995) Fos and bone cell development: lessons from a nuclear oncogene. *Trends Genet* 11: 436-441.
22. Acampora D, Merlo GR, Paleari L, Zerega B, Postiglione MP, et al. (1999) Craniofacial, vestibular and bone defects in mice lacking the Distal-less-related gene *Dlx5*. *Development* 126: 3795-3809.

23. Liu YH, Tang Z, Kundu RK, Wu L, Luo W, et al. (1999) Msx2 gene dosage influences the number of proliferative osteogenic cells in growth centers of the developing murine skull: a possible mechanism for MSX2-mediated craniosynostosis in humans. *Dev Biol* 205: 260-274.
24. Yousfi M, Lasmoles F, Lomri A, Delannoy P, Marie PJ (2001) Increased bone formation and decreased osteocalcin expression induced by reduced Twist dosage in Saethre-Chotzen syndrome. *J Clin Invest* 107: 1153-1161.
25. Bodine PV, Komm BS (2006) Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* 7: 33-39.
26. Kubota T, Michigami T, Ozono K (2009) Wnt signaling in bone metabolism. *J Bone Miner Metab* 27: 265-271.
27. Moester MJ, Papapoulos SE, Lowik CW, van Bezooijen RL (2010) Sclerostin: current knowledge and future perspectives. *Calcif Tissue Int* 87: 99-107.
28. Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, Smith SY, Stouch B, et al. (2010) Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. *J Bone Miner Res* 25: 948-959.
29. Noble BS (2008) The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 473: 106-111.
30. Gu G, Mulari M, Peng Z, Hentunen TA, Vaananen HK (2005) Death of osteocytes turns off the inhibition of osteoclasts and triggers local bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 1095-1101.
31. Lian JB, Stein GS (1995) Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J* 15: 118-140.
32. Parfitt AM (2002) Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 30: 5-7.
33. Devogelaer JP, Boutsen Y, Manicourt DH (2010) Biologicals in osteoporosis: teriparatide and parathyroid hormone in women and men. *Curr Osteoporos Rep* 8: 154-161.
34. Atkins GJ, Anderson PH, Findlay DM, Welldon KJ, Vincent C, et al. (2007) Metabolism of vitamin D3 in human osteoblasts: evidence for autocrine and paracrine activities of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Bone* 40: 1517-1528.
35. Takayanagi H (2010) New immune connections in osteoclast formation. *Ann N Y Acad Sci* 1192: 117-123.
36. Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, et al. (2001) Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13960-13965.
37. Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, et al. (2000) Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. *J Clin Invest* 106: 1229-1237.
38. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, et al. (2000) Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 100: 197-207.
39. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, et al. (2005) Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 434: 514-520.
40. Mundy GR (2002) Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2: 584-593.
41. Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, et al. (2003) A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* 3: 537-549.
42. Hauschka PV, Mavrikos AE, Iafrati MD, Doleman SE, Klagsbrun M (1986) Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *J Biol Chem* 261: 12665-12674.
43. Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, Rhim JS (2010) CXCR4 and cancer. *Pathol Int* 60: 497-505.
44. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, et al. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410: 50-56.
45. Smith MC, Luker KE, Garbow JR, Prior JL, Jackson E, et al. (2004) CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res* 64: 8604-8612.

46. Richert MM, Vaidya KS, Mills CN, Wong D, Korz W, et al. (2009) Inhibition of CXCR4 by CTCE-9908 inhibits breast cancer metastasis to lung and bone. *Oncol Rep* 21: 761-767.
47. Jones DH, Nakashima T, Sanchez OH, Kozieradzki I, Komarova SV, et al. (2006) Regulation of cancer cell migration and bone metastasis by RANKL. *Nature* 440: 692-696.
48. Terpos E, Politou M, Szydlo R, Nadal E, Avery S, et al. (2004) Autologous stem cell transplantation normalizes abnormal bone remodeling and sRANKL/osteoprotegerin ratio in patients with multiple myeloma. *Leukemia* 18: 1420-1426.
49. Sung V, Stubbs JT, 3rd, Fisher L, Aaron AD, Thompson EW (1998) Bone sialoprotein supports breast cancer cell adhesion proliferation and migration through differential usage of the alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrins. *J Cell Physiol* 176: 482-494.
50. Pecheur I, Peyruchaud O, Serre CM, Guglielmi J, Volland C, et al. (2002) Integrin alpha(v)beta3 expression confers on tumor cells a greater propensity to metastasize to bone. *Faseb J* 16: 1266-1268.
51. van der P, Vloedgraven H, Papapoulos S, Lowick C, Grzesik W, et al. (1997) Attachment characteristics and involvement of integrins in adhesion of breast cancer cell lines to extracellular bone matrix components. *Lab Invest* 77: 665-675.
52. Zhao Y, Bachelier R, Treilleux I, Pujuguet P, Peyruchaud O, et al. (2007) Tumor alphavbeta3 integrin is a therapeutic target for breast cancer bone metastases. *Cancer Res* 67: 5821-5830.
53. Karadag A, Ogbureke KU, Fedarko NS, Fisher LW (2004) Bone sialoprotein, matrix metalloproteinase 2, and alpha(v)beta3 integrin in osteotropic cancer cell invasion. *J Natl Cancer Inst* 96: 956-965.
54. Hall CL, Dai J, van Golen KL, Keller ET, Long MW (2006) Type I collagen receptor (alpha 2 beta 1) signaling promotes the growth of human prostate cancer cells within the bone. *Cancer Res* 66: 8648-8654.
55. Littlewood-Evans AJ, Bilbe G, Bowler WB, Farley D, Wlodarski B, et al. (1997) The osteoclast-associated protease cathepsin K is expressed in human breast carcinoma. *Cancer Res* 57: 5386-5390.
56. Brubaker KD, Vessella RL, True LD, Thomas R, Corey E (2003) Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *J Bone Miner Res* 18: 222-230.
57. Le Gall C, Bellahcene A, Bonnelye E, Gasser JA, Castronovo V, et al. (2007) A cathepsin K inhibitor reduces breast cancer induced osteolysis and skeletal tumor burden. *Cancer Res* 67: 9894-9902.
58. Quintanilla-Dieck MJ, Codriansky K, Keady M, Bhawan J, Runger TM (2008) Cathepsin K in melanoma invasion. *J Invest Dermatol* 128: 2281-2288.
59. Bellahcene A, Bachelier R, Detry C, Lidereau R, Clezardin P, et al. (2007) Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 101: 135-148.
60. Zayzafoon M, Abdulkadir SA, McDonald JM (2004) Notch signaling and ERK activation are important for the osteomimetic properties of prostate cancer bone metastatic cell lines. *J Biol Chem* 279: 3662-3670.
61. Shih LY, Shih HN, Chen TH (2004) Bone resorption activity of osteolytic metastatic lung and breast cancers. *J Orthop Res* 22: 1161-1167.
62. Peyruchaud O, Boucharaba A, Saulnier-Blache JS, Clezardin P (2005) [Lysophosphatidic acid: a new link between blood platelets and bone metastasis]. *Med Sci (Paris)* 21: 353-355.
63. Mills GB, Moolenaar WH (2003) The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat Rev Cancer* 3: 582-591.
64. Garcia T, Jackson A, Bachelier R, Clement-Lacroix P, Baron R, et al. (2008) A convenient clinically relevant model of human breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis* 25: 33-42.
65. Clines GA, Guise TA (2005) Hypercalcaemia of malignancy and basic research on mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic metastasis to bone. *Endocr Relat Cancer* 12: 549-583.

66. Guise TA (1997) Parathyroid hormone-related protein and bone metastases. *Cancer* 80: 1572-1580.
67. Yin JJ, Selander K, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, et al. (1999) TGF-beta signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103: 197-206.
68. Thomas RJ, Guise TA, Yin JJ, Elliott J, Horwood NJ, et al. (1999) Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation. *Endocrinology* 140: 4451-4458.
69. Guise TA, Yin JJ, Taylor SD, Kumagai Y, Dallas M, et al. (1996) Evidence for a causal role of parathyroid hormone-related protein in the pathogenesis of human breast cancer-mediated osteolysis. *J Clin Invest* 98: 1544-1549.
70. Pollock JH, Blaha MJ, Lavish SA, Stevenson S, Greenfield EM (1996) In vivo demonstration that parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein stimulate expression by osteoblasts of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor. *J Bone Miner Res* 11: 754-759.
71. Shimo T, Kubota S, Yoshioka N, Ibaragi S, Isowa S, et al. (2006) Pathogenic role of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in osteolytic metastasis of breast cancer. *J Bone Miner Res* 21: 1045-1059.
72. Powell GJ, Southby J, Danks JA, Stillwell RG, Hayman JA, et al. (1991) Localization of parathyroid hormone-related protein in breast cancer metastases: increased incidence in bone compared with other sites. *Cancer Res* 51: 3059-3061.
73. Vargas SJ, Gillespie MT, Powell GJ, Southby J, Danks JA, et al. (1992) Localization of parathyroid hormone-related protein mRNA expression in breast cancer and metastatic lesions by in situ hybridization. *J Bone Miner Res* 7: 971-979.
74. Henderson MA, Danks JA, Slavin JL, Byrnes GB, Choong PF, et al. (2006) Parathyroid hormone-related protein localization in breast cancers predict improved prognosis. *Cancer Res* 66: 2250-2256.
75. Ara T, Declerck YA (2010) Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer* 46: 1223-1231.
76. Singh B, Berry JA, Shoher A, Lucci A (2006) COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells. *J Surg Res* 131: 267-275.
77. Sotiriou C, Lacroix M, Lespagnard L, Larsimont D, Paesmans M, et al. (2001) Interleukins-6 and -11 expression in primary breast cancer and subsequent development of bone metastases. *Cancer Lett* 169: 87-95.
78. Park BK, Zhang H, Zeng Q, Dai J, Keller ET, et al. (2007) NF-kappaB in breast cancer cells promotes osteolytic bone metastasis by inducing osteoclastogenesis via GM-CSF. *Nat Med* 13: 62-69.
79. Lu Y, Cai Z, Xiao G, Keller ET, Mizokami A, et al. (2007) Monocyte chemotactic protein-1 mediates prostate cancer-induced bone resorption. *Cancer Res* 67: 3646-3653.
80. Hiraga T, Myoui A, Choi ME, Yoshikawa H, Yoneda T (2006) Stimulation of cyclooxygenase-2 expression by bone-derived transforming growth factor-beta enhances bone metastases in breast cancer. *Cancer Res* 66: 2067-2073.
81. Singh B, Berry JA, Shoher A, Ayers GD, Wei C, et al. (2007) COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. *Oncogene* 26: 3789-3796.
82. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM (2004) Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 341: 19-39.
83. Logothetis CJ, Lin SH (2005) Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5: 21-28.
84. Schwaninger R, Rentsch CA, Wetterwald A, van der Horst G, van Bezooijen RL, et al. (2007) Lack of noggin expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases. *Am J Pathol* 170: 160-175.
85. Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86: 599-606.
86. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, et al. (2002) Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420: 636-642.

87. Garnero P, Tabassi NC, Voorzanger-Rousselot N (2008) Circulating dickkopf-1 and radiological progression in patients with early rheumatoid arthritis treated with etanercept. *J Rheumatol* 35: 2313-2315.
88. Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Journe F, Doriath V, Body JJ, et al. (2007) Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br J Cancer* 97: 964-970.
89. Liao J, Schneider A, Datta NS, McCauley LK (2006) Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metastasis. *Cancer Res* 66: 9065-9073.
90. Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Butters RR, et al. (2000) Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* 141: 4357-4364.
91. Mentaverri R, Yano S, Chattopadhyay N, Petit L, Kifor O, et al. (2006) The calcium sensing receptor is directly involved in both osteoclast differentiation and apoptosis. *FASEB J* 20: 2562-2564.
92. Deckers M, van Dinther M, Buijs J, Que I, Lowik C, et al. (2006) The tumor suppressor Smad4 is required for transforming growth factor beta-induced epithelial to mesenchymal transition and bone metastasis of breast cancer cells. *Cancer Res* 66: 2202-2209.
93. Javelaud D, Mohammad KS, McKenna CR, Fournier P, Luciani F, et al. (2007) Stable overexpression of Smad7 in human melanoma cells impairs bone metastasis. *Cancer Res* 67: 2317-2324.
94. Mundy GR (1997) Mechanisms of bone metastasis. *Cancer* 80: 1546-1556.
95. Ooi LL, Zheng Y, Zhou H, Trivedi T, Conigrave AD, et al. (2010) Vitamin D deficiency promotes growth of MCF-7 human breast cancer in a rodent model of osteosclerotic bone metastasis. *Bone*.
96. Zheng Y, Zhou H, Modzelewski JR, Kalak R, Blair JM, et al. (2007) Accelerated bone resorption, due to dietary calcium deficiency, promotes breast cancer tumor growth in bone. *Cancer Res* 67: 9542-9548.
97. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Koo J, Hood N (2009) Prognostic effects of 25-hydroxyvitamin D levels in early breast cancer. *J Clin Oncol* 27: 3757-3763.
98. Yin JJ, Mohammad KS, Kakonen SM, Harris S, Wu-Wong JR, et al. (2003) A causal role for endothelin-1 in the pathogenesis of osteoblastic bone metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10954-10959.
99. Clezardin P, Teti A (2007) Bone metastasis: pathogenesis and therapeutic implications. *Clin Exp Metastasis* 24: 599-608.
100. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, et al. (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339.
101. Cornish J, Grey A, Callon KE, Naot D, Hill BL, et al. (2004) Shared pathways of osteoblast mitogenesis induced by amylin, adrenomedullin, and IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 240-246.
102. Bhalla A, Haque S, Taylor I, Winslet M, Loizidou M (2009) Endothelin receptor antagonism and cancer. *Eur J Clin Invest* 39 Suppl 2: 74-77.
103. Nelson JB (2003) Endothelin inhibition: novel therapy for prostate cancer. *J Urol* 170: S65-67; discussion S67-68.
104. Carducci MA, Padley RJ, Breul J, Vogelzang NJ, Zonnenberg BA, et al. (2003) Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 21: 679-689.
105. Clines GA, Mohammad KS, Bao Y, Stephens OW, Suva LJ, et al. (2007) Dickkopf homolog 1 mediates endothelin-1-stimulated new bone formation. *Mol Endocrinol* 21: 486-498.
106. Chiao JW, Moonga BS, Yang YM, Kancharla R, Mittelman A, et al. (2000) Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *Br J Cancer* 83: 360-365.

107. Goya M, Ishii G, Miyamoto S, Hasebe T, Nagai K, et al. (2006) Prostate-specific antigen induces apoptosis of osteoclast precursors: potential role in osteoblastic bone metastases of prostate cancer. *Prostate* 66: 1573-1584.
108. Yonou H, Horiguchi Y, Ohno Y, Namiki K, Yoshioka K, et al. (2007) Prostate-specific antigen stimulates osteoprotegerin production and inhibits receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human osteoblasts. *Prostate* 67: 840-848.
109. Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Wang Y, Yoneda T (2002) Tumor-derived platelet-derived growth factor-BB plays a critical role in osteosclerotic bone metastasis in an animal model of human breast cancer. *Cancer Res* 62: 917-923.
110. Kitagawa Y, Dai J, Zhang J, Keller JM, Nor J, et al. (2005) Vascular endothelial growth factor contributes to prostate cancer-mediated osteoblastic activity. *Cancer Res* 65: 10921-10929.
111. Vogt W (1963) Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochem Pharmacol* 12: 415-420.
112. Simon MF, Chap H, Douste-Blazy L (1984) Platelet aggregating activity of lysophosphatidic acids is not related to their calcium ionophore properties. *FEBS Lett* 166: 115-119.
113. Jalink K, van Corven EJ, Moolenaar WH (1990) Lysophosphatidic acid, but not phosphatidic acid, is a potent Ca^{2+} -mobilizing stimulus for fibroblasts. Evidence for an extracellular site of action. *J Biol Chem* 265: 12232-12239.
114. Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* 135: 1071-1083.
115. Tokumura A, Harada K, Fukuzawa K, Tsukatani H (1986) Involvement of lysophospholipase D in the production of lysophosphatidic acid in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 875: 31-38.
116. Umezū-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, et al. (2002) Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 158: 227-233.
117. Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, et al. (2002) Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J Biol Chem* 277: 39436-39442.
118. Xie Y, Gibbs TC, Meier KE (2002) Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator. *Biochim Biophys Acta* 1582: 270-281.
119. Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, et al. (1999) Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 6931-6936.
120. Goetzl EJ, Lee H, Azuma T, Stossel TP, Turck CW, et al. (2000) Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 275: 14573-14578.
121. Gerrard JM, Robinson P (1989) Identification of the molecular species of lysophosphatidic acid produced when platelets are stimulated by thrombin. *Biochim Biophys Acta* 1001: 282-285.
122. Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH (1993) The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 291 (Pt 3): 677-680.
123. Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, et al. (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell* 80: 919-927.
124. Brindley DN, Pilquil C (2009) Lipid phosphate phosphatases and signaling. *J Lipid Res* 50 Suppl: S225-230.
125. Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, et al. (2006) Autotaxin stabilizes blood vessels and is required for embryonic vasculature by producing lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 281: 25822-25830.
126. Tsuda S, Okudaira S, Moriya-Ito K, Shimamoto C, Tanaka M, et al. (2006) Cyclic phosphatidic acid is produced by autotaxin in blood. *J Biol Chem* 281: 26081-26088.
127. Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, et al. (2002) Serum lysophosphatidic acid is produced through diverse phospholipase pathways. *J Biol Chem* 277: 48737-48744.

128. Tokumura A, Miyake M, Nishioka Y, Yamano S, Aono T, et al. (1999) Production of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in human follicular fluids of In vitro fertilization patients. *Biol Reprod* 61: 195-199.
129. Thumser AE, Voysey JE, Wilton DC (1994) The binding of lysophospholipids to rat liver fatty acid-binding protein and albumin. *Biochem J* 301 (Pt 3): 801-806.
130. Croset M, Brossard N, Polette A, Lagarde M (2000) Characterization of plasma unsaturated lysophosphatidylcholines in human and rat. *Biochem J* 345 Pt 1: 61-67.
131. Aoki J (2004) Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol* 15: 477-489.
132. Brindley DN (2004) Lipid phosphate phosphatases and related proteins: signaling functions in development, cell division, and cancer. *J Cell Biochem* 92: 900-912.
133. Sonoda H, Aoki J, Hiramatsu T, Ishida M, Bandoh K, et al. (2002) A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 277: 34254-34263.
134. Eder AM, Sasagawa T, Mao M, Aoki J, Mills GB (2000) Constitutive and lysophosphatidic acid (LPA)-induced LPA production: role of phospholipase D and phospholipase A2. *Clin Cancer Res* 6: 2482-2491.
135. Zachowski A (1993) Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem J* 294 (Pt 1): 1-14.
136. Pages C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS (2001) Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 64: 1-10.
137. Thompson FJ, Clark MA (1994) Purification of a lysophosphatidic acid-hydrolysing lysophospholipase from rat brain. *Biochem J* 300 (Pt 2): 457-461.
138. Pyne S, Kong KC, Darroch PI (2004) Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate biology: the role of lipid phosphate phosphatases. *Semin Cell Dev Biol* 15: 491-501.
139. Tanaka M, Kishi Y, Takanezawa Y, Kakehi Y, Aoki J, et al. (2004) Prostatic acid phosphatase degrades lysophosphatidic acid in seminal plasma. *FEBS Lett* 571: 197-204.
140. Lin MF, Meng TC, Rao PS, Chang C, Schonthal AH, et al. (1998) Expression of human prostatic acid phosphatase correlates with androgen-stimulated cell proliferation in prostate cancer cell lines. *J Biol Chem* 273: 5939-5947.
141. Tanyi JL, Morris AJ, Wolf JK, Fang X, Hasegawa Y, et al. (2003) The human lipid phosphate phosphatase-3 decreases the growth, survival, and tumorigenesis of ovarian cancer cells: validation of the lysophosphatidic acid signaling cascade as a target for therapy in ovarian cancer. *Cancer Res* 63: 1073-1082.
142. Tanyi JL, Hasegawa Y, Lapushin R, Morris AJ, Wolf JK, et al. (2003) Role of decreased levels of lipid phosphate phosphatase-1 in accumulation of lysophosphatidic acid in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 9: 3534-3545.
143. Tomsig JL, Snyder AH, Berdyshev EV, Skobeleva A, Mataya C, et al. (2009) Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo. *Biochem J* 419: 611-618.
144. Yue J, Yokoyama K, Balazs L, Baker DL, Smalley D, et al. (2004) Mice with transgenic overexpression of lipid phosphate phosphatase-1 display multiple organotypic deficits without alteration in circulating lysophosphatidate level. *Cell Signal* 16: 385-399.
145. Moolenaar WH, van Meeteren LA, Giepmans BN (2004) The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26: 870-881.
146. Takuwa Y, Takuwa N, Sugimoto N (2002) The Edg family G protein-coupled receptors for lysophospholipids: their signaling properties and biological activities. *J Biochem* 131: 767-771.
147. Yanagida K, Ishii S, Hamano F, Noguchi K, Shimizu T (2007) LPA4/p2y9/GPR23 mediates rho-dependent morphological changes in a rat neuronal cell line. *J Biol Chem* 282: 5814-5824.
148. Ishii S, Noguchi K, Yanagida K (2009) Non-Edg family lysophosphatidic acid (LPA) receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89: 57-65.

149. Lee CW, Rivera R, Gardell S, Dubin AE, Chun J (2006) GPR92 as a new G12/13- and Gq-coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP, LPA5. *J Biol Chem* 281: 23589-23597.
150. Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N (2008) Identification of the orphan GPCR, P2Y(10) receptor as the sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 371: 707-712.
151. Pasternack SM, von Kugelgen I, Aboud KA, Lee YA, Ruschendorf F, et al. (2008) G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet* 40: 329-334.
152. Tabata K, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N (2007) The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 861-866.
153. Oka S, Ota R, Shima M, Yamashita A, Sugiura T (2010) GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 395: 232-237.
154. McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, et al. (2003) Identification of an intracellular receptor for lysophosphatidic acid (LPA): LPA is a transcellular PPARgamma agonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 131-136.
155. Murch O, Collin M, Thiemermann C (2007) Lysophosphatidic acid reduces the organ injury caused by endotoxemia-a role for G-protein-coupled receptors and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Shock* 27: 48-54.
156. Simon MF, Daviaud D, Pradere JP, Gres S, Guigne C, et al. (2005) Lysophosphatidic acid inhibits adipocyte differentiation via lysophosphatidic acid 1 receptor-dependent down-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2. *J Biol Chem* 280: 14656-14662.
157. Fukushima N, Kimura Y, Chun J (1998) A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6151-6156.
158. Ishii I, Contos JJ, Fukushima N, Chun J (2000) Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol* 58: 895-902.
159. Zheng Y, Kong Y, Goetzl EJ (2001) Lysophosphatidic acid receptor-selective effects on Jurkat T cell migration through a Matrigel model basement membrane. *J Immunol* 166: 2317-2322.
160. Zheng Y, Voice JK, Kong Y, Goetzl EJ (2000) Altered expression and functional profile of lysophosphatidic acid receptors in mitogen-activated human blood T lymphocytes. *FASEB J* 14: 2387-2389.
161. Lee CW, Rivera R, Dubin AE, Chun J (2007) LPA(4)/GPR23 is a lysophosphatidic acid (LPA) receptor utilizing G(s)-, G(q)/G(i)-mediated calcium signaling and G(12/13)-mediated Rho activation. *J Biol Chem* 282: 4310-4317.
162. Kotarsky K, Boketoft A, Bristulf J, Nilsson NE, Norberg A, et al. (2006) Lysophosphatidic acid binds to and activates GPR92, a G protein-coupled receptor highly expressed in gastrointestinal lymphocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 619-628.
163. Bando K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, et al. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 274: 27776-27785.
164. Gohla A, Harhammer R, Schultz G (1998) The G-protein G13 but not G12 mediates signaling from lysophosphatidic acid receptor via epidermal growth factor receptor to Rho. *J Biol Chem* 273: 4653-4659.
165. Marrache AM, Gobeil F, Zhu T, Chemtob S (2005) Intracellular signaling of lipid mediators via cognate nuclear G protein-coupled receptors. *Endothelium* 12: 63-72.
166. Tigyi G (2010) Aiming drug discovery at lysophosphatidic acid targets. *Br J Pharmacol* 161: 241-270.
167. Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, et al. (2002) Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem* 277: 21197-21206.

168. Tokumura A, Fukuzawa K, Isobe J, Tsukatani H (1981) Lysophosphatidic acid-induced aggregation of human and feline platelets: structure-activity relationship. *Biochem Biophys Res Commun* 99: 391-398.
169. Noguchi K, Ishii S, Shimizu T (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* 278: 25600-25606.
170. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, Yung YC, Lee CW, et al. (2010) LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 157-186.
171. Stracke ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, et al. (1992) Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J Biol Chem* 267: 2524-2529.
172. Lee HY, Murata J, Clair T, Polymeropoulos MH, Torres R, et al. (1996) Cloning, chromosomal localization, and tissue expression of autotaxin from human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 218: 714-719.
173. Stefan C, Jansen S, Bollen M (2005) NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. *Trends Biochem Sci* 30: 542-550.
174. Bollen M, Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Stefan C (2000) Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 393-432.
175. Jansen S, Stefan C, Creemers JW, Waelkens E, Van Eynde A, et al. (2005) Proteolytic maturation and activation of autotaxin (NPP2), a secreted metastasis-enhancing lysophospholipase D. *J Cell Sci* 118: 3081-3089.
176. Koike S, Keino-Masu K, Ohto T, Masu M (2006) The N-terminal hydrophobic sequence of autotaxin (ENPP2) functions as a signal peptide. *Genes Cells* 11: 133-142.
177. Jansen S, Andries M, Derua R, Waelkens E, Bollen M (2009) Domain Interplay Mediated by an Essential Disulfide Linkage Is Critical for the Activity and Secretion of the Metastasis-promoting Enzyme Autotaxin. *J Biol Chem* 284: 14296-14302.
178. Okudaira S, Yukiura H, Aoki J (2010) Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie* 92: 698-706.
179. Deng G, Royle G, Wang S, Crain K, Loskutoff DJ (1996) Structural and functional analysis of the plasminogen activator inhibitor-1 binding motif in the somatomedin B domain of vitronectin. *J Biol Chem* 271: 12716-12723.
180. Gijsbers R, Ceulemans H, Stalmans W, Bollen M (2001) Structural and catalytic similarities between nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases and alkaline phosphatases. *J Biol Chem* 276: 1361-1368.
181. Lee HY, Clair T, Mulvaney PT, Woodhouse EC, Aznavoorian S, et al. (1996) Stimulation of tumor cell motility linked to phosphodiesterase catalytic site of autotaxin. *J Biol Chem* 271: 24408-24412.
182. Dennis J, White MA, Forrest AD, Yuelling LM, Nogaroli L, et al. (2008) Phosphodiesterase- α /autotaxin's MORFO domain regulates oligodendroglial process network formation and focal adhesion organization. *Mol Cell Neurosci* 37: 412-424.
183. Fox MA, Colello RJ, Macklin WB, Fuss B (2003) Phosphodiesterase- α /autotaxin: a counteradhesive protein expressed by oligodendrocytes during onset of myelination. *Mol Cell Neurosci* 23: 507-519.
184. Lewit-Bentley A, Rety S (2000) EF-hand calcium-binding proteins. *Curr Opin Struct Biol* 10: 637-643.
185. Lee J, Jung ID, Nam SW, Clair T, Jeong EM, et al. (2001) Enzymatic activation of autotaxin by divalent cations without EF-hand loop region involvement. *Biochem Pharmacol* 62: 219-224.
186. Jansen S, Callewaert N, Dewerte I, Andries M, Ceulemans H, et al. (2007) An essential oligomannosidic glycan chain in the catalytic domain of autotaxin, a secreted lysophospholipase-D. *J Biol Chem* 282: 11084-11091.
187. Koh E, Bandle RW, Roberts DD, Stracke ML, Clair T (2009) Novel point mutations attenuate autotaxin activity. *Lipids Health Dis* 8: 4.

188. Murata J, Lee HY, Clair T, Krutzsch HC, Arestad AA, et al. (1994) cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J Biol Chem* 269: 30479-30484.
189. Fuss B, Baba H, Phan T, Tuohy VK, Macklin WB (1997) Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci* 17: 9095-9103.
190. Kawagoe H, Stracke ML, Nakamura H, Sano K (1997) Expression and transcriptional regulation of the PD-lalpha/autotaxin gene in neuroblastoma. *Cancer Res* 57: 2516-2521.
191. van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, et al. (2006) Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26: 5015-5022.
192. Clair T, Aoki J, Koh E, Bandle RW, Nam SW, et al. (2003) Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res* 63: 5446-5453.
193. Baker DL, Fujiwara Y, Pigg KR, Tsukahara R, Kobayashi S, et al. (2006) Carba analogs of cyclic phosphatidic acid are selective inhibitors of autotaxin and cancer cell invasion and metastasis. *J Biol Chem* 281: 22786-22793.
194. Webb DJ, Parsons JT, Horwitz AF (2002) Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol* 4: E97-100.
195. Jansen S, Andries M, Vekemans K, Vanbilloen H, Verbruggen A, et al. (2009) Rapid clearance of the circulating metastatic factor autotaxin by the scavenger receptors of liver sinusoidal endothelial cells. *Cancer Lett*.
196. Chen M, O'Connor KL (2005) Integrin alpha6beta4 promotes expression of autotaxin/ENPP2 autocrine motility factor in breast carcinoma cells. *Oncogene* 24: 5125-5130.
197. Black EJ, Clair T, Delrow J, Neiman P, Gillespie DA (2004) Microarray analysis identifies Autotaxin, a tumour cell motility and angiogenic factor with lysophospholipase D activity, as a specific target of cell transformation by v-Jun. *Oncogene* 23: 2357-2366.
198. Ohuchi H, Hayashibara Y, Matsuda H, Onoi M, Mitsumori M, et al. (2007) Diversified expression patterns of autotaxin, a gene for phospholipid-generating enzyme during mouse and chicken development. *Dev Dyn* 236: 1134-1143.
199. Bachner D, Ahrens M, Betat N, Schroder D, Gross G (1999) Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech Dev* 84: 121-125.
200. Liszewska E, Reinaud P, Billon-Denis E, Dubois O, Robin P, et al. (2009) Lysophosphatidic acid signaling during embryo development in sheep: involvement in prostaglandin synthesis. *Endocrinology* 150: 422-434.
201. Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, et al. (2002) Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice: signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to lpa(2). *Mol Cell Biol* 22: 6921-6929.
202. Ye X, Skinner MK, Kennedy G, Chun J (2008) Age-dependent loss of sperm production in mice via impaired lysophosphatidic acid signaling. *Biol Reprod* 79: 328-336.
203. Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, et al. (2010) LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood*.
204. Estivill-Torrus G, Llebreg-Zayas P, Matas-Rico E, Santin L, Pedraza C, et al. (2008) Absence of LPA1 signaling results in defective cortical development. *Cereb Cortex* 18: 938-950.
205. Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J (2000) Requirement for the lpa1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 13384-13389.
206. Weiner JA, Fukushima N, Contos JJ, Scherer SS, Chun J (2001) Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated lysophosphatidic acid signaling. *J Neurosci* 21: 7069-7078.

207. Harrison SM, Reavill C, Brown G, Brown JT, Cluderay JE, et al. (2003) LPA1 receptor-deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Mol Cell Neurosci* 24: 1170-1179.
208. Pradere JP, Klein J, Gres S, Guigne C, Neau E, et al. (2007) LPA1 receptor activation promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 18: 3110-3118.
209. Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, et al. (2008) The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 14: 45-54.
210. Zhao Y, Tong J, He D, Pendyala S, Evgeny B, et al. (2009) Role of lysophosphatidic acid receptor LPA2 in the development of allergic airway inflammation in a murine model of asthma. *Respir Res* 10: 114.
211. Ye LY, Zhao ZM, Wang MH, Luo SJ, Su CC, et al. (2006) [Differentially expressed genes between a fertile patient and an infertile patient in a large Chinese androgen insensitivity syndrome pedigree]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 28: 219-224.
212. Liu YB, Kharode Y, Bodine PV, Yaworsky PJ, Robinson JA, et al. (2010) LPA induces osteoblast differentiation through interplay of two receptors: LPA1 and LPA4. *J Cell Biochem* 109: 794-800.
213. Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, et al. (2008) Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell* 19: 5435-5445.
214. Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJ, Higgins CM, Chun J (2003) Non-proliferative effects of lysophosphatidic acid enhance cortical growth and folding. *Nat Neurosci* 6: 1292-1299.
215. Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, et al. (2004) Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic acid receptor signaling. *Nat Med* 10: 712-718.
216. Shano S, Moriyama R, Chun J, Fukushima N (2008) Lysophosphatidic acid stimulates astrocyte proliferation through LPA1. *Neurochem Int* 52: 216-220.
217. Spohr TC, Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rehen SK, et al. (2008) Lysophosphatidic acid receptor-dependent secondary effects via astrocytes promote neuronal differentiation. *J Biol Chem* 283: 7470-7479.
218. Matas-Rico E, Garcia-Diaz B, Llebreg-Zayas P, Lopez-Barroso D, Santin L, et al. (2008) Deletion of lysophosphatidic acid receptor LPA1 reduces neurogenesis in the mouse dentate gyrus. *Mol Cell Neurosci* 39: 342-355.
219. Pradere JP, Gonzalez J, Klein J, Valet P, Gres S, et al. (2008) Lysophosphatidic acid and renal fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 1781: 582-587.
220. Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, et al. (2005) LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 435: 104-108.
221. Dziak R, Yang BM, Leung BW, Li S, Marzec N, et al. (2003) Effects of sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid on human osteoblastic cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68: 239-249.
222. Grey A, Banovic T, Naot D, Hill B, Callon K, et al. (2001) Lysophosphatidic acid is an osteoblast mitogen whose proliferative actions involve G(i) proteins and protein kinase C, but not P42/44 mitogen-activated protein kinases. *Endocrinology* 142: 1098-1106.
223. Waters KM, Tan R, Genetos DC, Verma S, Yellowley CE, et al. (2007) DNA microarray analysis reveals a role for lysophosphatidic acid in the regulation of anti-inflammatory genes in MC3T3-E1 cells. *Bone* 41: 833-841.
224. Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke HZ, Sims SM, et al. (2007) P2X7 nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 282: 3403-3412.
225. Panupinthu N, Rogers JT, Zhao L, Solano-Flores LP, Possmayer F, et al. (2008) P2X7 receptors on osteoblasts couple to production of lysophosphatidic acid: a signaling axis promoting osteogenesis. *J Cell Biol* 181: 859-871.

226. Koolpe M, Rodrigo JJ, Benton HP (1998) Adenosine 5'-triphosphate, uridine 5'-triphosphate, bradykinin, and lysophosphatidic acid induce different patterns of calcium responses by human articular chondrocytes. *J Orthop Res* 16: 217-226.
227. Kim MK, Lee HY, Park KS, Shin EH, Jo SH, et al. (2005) Lysophosphatidic acid stimulates cell proliferation in rat chondrocytes. *Biochem Pharmacol* 70: 1764-1771.
228. Boyan BD, Hurst-Kennedy J, Denison TA, Schwartz Z (2010) 24R,25-dihydroxyvitamin D3 [24R,25(OH)2D3] controls growth plate development by inhibiting apoptosis in the reserve zone and stimulating response to 1 α ,25(OH)2D3 in hypertrophic cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 121: 212-216.
229. Facchini A, Borzi RM, Flamigni F (2005) Induction of ornithine decarboxylase in T/C-28a2 chondrocytes by lysophosphatidic acid: signaling pathway and inhibition of cell proliferation. *FEBS Lett* 579: 2919-2925.
230. Mototani H, Iida A, Nakajima M, Furuichi T, Miyamoto Y, et al. (2008) A functional SNP in EDG2 increases susceptibility to knee osteoarthritis in Japanese. *Hum Mol Genet* 17: 1790-1797.
231. Tanaka Y (2010) [Cytokines in bone diseases. Anti-cytokine therapies for bone and joint diseases.]. *Clin Calcium* 20: 1545-1552.
232. Zhao C, Fernandes MJ, Prestwich GD, Turgeon M, Di Battista J, et al. (2008) Regulation of lysophosphatidic acid receptor expression and function in human synoviocytes: implications for rheumatoid arthritis? *Mol Pharmacol* 73: 587-600.
233. Karagiosis SA, Chrisler WB, Bollinger N, Karin NJ (2009) Lysophosphatidic acid-induced ERK activation and chemotaxis in MC3T3-E1 preosteoblasts are independent of EGF receptor transactivation. *J Cell Physiol* 219: 716-723.
234. Gidley J, Openshaw S, Pring ET, Sale S, Mansell JP (2006) Lysophosphatidic acid cooperates with 1 α ,25(OH)2D3 in stimulating human MG63 osteoblast maturation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 80: 46-61.
235. Grey A, Chen Q, Callon K, Xu X, Reid IR, et al. (2002) The phospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid prevent apoptosis in osteoblastic cells via a signaling pathway involving G(i) proteins and phosphatidylinositol-3 kinase. *Endocrinology* 143: 4755-4763.
236. Mansell JP, Farrar D, Jones S, Nowghani M (2009) Cytoskeletal reorganisation, 1 α ,25-dihydroxy vitamin D3 and human MG63 osteoblast maturation. *Mol Cell Endocrinol* 305: 38-46.
237. Caverzasio J, Palmer G, Suzuki A, Bonjour JP (2000) Evidence for the involvement of two pathways in activation of extracellular signal-regulated kinase (Erk) and cell proliferation by Gi and Gq protein-coupled receptors in osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 15: 1697-1706.
238. Aki Y, Kondo A, Nakamura H, Togari A (2008) Lysophosphatidic acid-stimulated interleukin-6 and -8 synthesis through LPA1 receptors on human osteoblasts. *Arch Oral Biol* 53: 207-213.
239. Lapierre DM, Tanabe N, Pereverzev A, Spencer M, Shugg RP, et al. (2010) Lysophosphatidic acid signals through multiple receptors in osteoclasts to elevate cytosolic calcium concentration, evoke retraction, and promote cell survival. *J Biol Chem* 285: 25792-25801.
240. Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, et al. (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3: 889-901.
241. McMichael BK, Meyer SM, Lee BS (2010) c-Src-mediated Phosphorylation of Thyroid Hormone Receptor-interacting Protein 6 (TRIP6) Promotes Osteoclast Sealing Zone Formation. *J Biol Chem* 285: 26641-26651.
242. Inoue M, Ma L, Aoki J, Chun J, Ueda H (2008) Autotaxin, a synthetic enzyme of lysophosphatidic acid (LPA), mediates the induction of nerve-injured neuropathic pain. *Mol Pain* 4: 6.
243. Yoneda T, Hata K, Nakanishi M, Nagae M, Nagayama T, et al. (2010) Involvement of acidic microenvironment in the pathophysiology of cancer-associated bone pain. *Bone*.
244. Zhao J, Pan HL, Li TT, Zhang YQ, Wei JY, et al. (2010) The sensitization of peripheral C-fibers to lysophosphatidic acid in bone cancer pain. *Life Sci* 87: 120-125.

245. van Corven EJ, van Rijswijk A, Jalink K, van der Bend RL, van Blitterswijk WJ, et al. (1992) Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J* 281 (Pt 1): 163-169.
246. van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 59: 45-54.
247. Cook SJ, McCormick F (1996) Kinetic and biochemical correlation between sustained p44ERK1 (44 kDa extracellular signal-regulated kinase 1) activation and lysophosphatidic acid-stimulated DNA synthesis in Rat-1 cells. *Biochem J* 320 (Pt 1): 237-245.
248. Piazza GA, Ritter JL, Baracka CA (1995) Lysophosphatidic acid induction of transforming growth factors alpha and beta: modulation of proliferation and differentiation in cultured human keratinocytes and mouse skin. *Exp Cell Res* 216: 51-64.
249. Yang M, Zhong WW, Srivastava N, Slavin A, Yang J, et al. (2005) G protein-coupled lysophosphatidic acid receptors stimulate proliferation of colon cancer cells through the {beta}-catenin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 6027-6032.
250. Liu S, Umezū-Goto M, Murph M, Lu Y, Liu W, et al. (2009) Expression of autotaxin and lysophosphatidic acid receptors increases mammary tumorigenesis, invasion, and metastases. *Cancer Cell* 15: 539-550.
251. Lin S, Wang D, Iyer S, Ghaleb AM, Shim H, et al. (2009) The absence of LPA2 attenuates tumor formation in an experimental model of colitis-associated cancer. *Gastroenterology* 136: 1711-1720.
252. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D (2005) Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res* 65: 5991-5995; discussion 5995.
253. Yang SY, Lee J, Park CG, Kim S, Hong S, et al. (2002) Expression of autotaxin (NPP-2) is closely linked to invasiveness of breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 19: 603-608.
254. Kehlen A, Englert N, Seifert A, Klonisch T, Dralle H, et al. (2004) Expression, regulation and function of autotaxin in thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 109: 833-838.
255. Gaetano CG, Samadi N, Tomsig JL, Macdonald TL, Lynch KR, et al. (2009) Inhibition of autotaxin production or activity blocks lysophosphatidylcholine-induced migration of human breast cancer and melanoma cells. *Mol Carcinog*.
256. Imamura F, Horai T, Mukai M, Shinkai K, Sawada M, et al. (1993) Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D. *Biochem Biophys Res Commun* 193: 497-503.
257. Matsumoto Y, Tanaka K, Harimaya K, Nakatani F, Matsuda S, et al. (2001) Small GTP-binding protein, Rho, both increased and decreased cellular motility, activation of matrix metalloproteinase 2 and invasion of human osteosarcoma cells. *Jpn J Cancer Res* 92: 429-438.
258. Chen M, Towers LN, O'Connor KL (2007) LPA2 (EDG4) mediates Rho-dependent chemotaxis with lower efficacy than LPA1 (EDG2) in breast carcinoma cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1927-1933.
259. Gustin C, Van Steenbrugge M, Raes M (2008) LPA modulates monocyte migration directly and via LPA-stimulated endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C905-914.
260. Shida D, Kitayama J, Yamaguchi H, Hama K, Aoki J, et al. (2004) Dual mode regulation of migration by lysophosphatidic acid in human gastric cancer cells. *Exp Cell Res* 301: 168-178.
261. Kranenburg O, Poland M, van Horck FP, Drechsel D, Hall A, et al. (1999) Activation of RhoA by lysophosphatidic acid and Galpha12/13 subunits in neuronal cells: induction of neurite retraction. *Mol Biol Cell* 10: 1851-1857.
262. Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, et al. (2004) Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem* 279: 17634-17639.

263. Komachi M, Tomura H, Malchinkhuu E, Tobo M, Mogi C, et al. (2009) LPA1 receptors mediate stimulation, whereas LPA2 receptors mediate inhibition, of migration of pancreatic cancer cells in response to lysophosphatidic acid and malignant ascites. *Carcinogenesis* 30: 457-465.
264. Ren J, Xiao YJ, Singh LS, Zhao X, Zhao Z, et al. (2006) Lysophosphatidic acid is constitutively produced by human peritoneal mesothelial cells and enhances adhesion, migration, and invasion of ovarian cancer cells. *Cancer Res* 66: 3006-3014.
265. Checovich WJ, Mosher DF (1993) Lysophosphatidic acid enhances fibronectin binding to adherent cells. *Arterioscler Thromb* 13: 1662-1667.
266. Webb DJ, Donais K, Whitmore LA, Thomas SM, Turner CE, et al. (2004) FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6: 154-161.
267. Bian D, Mahanivong C, Yu J, Frisch SM, Pan ZK, et al. (2006) The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene* 25: 2234-2244.
268. Bian D, Su S, Mahanivong C, Cheng RK, Han Q, et al. (2004) Lysophosphatidic Acid Stimulates Ovarian Cancer Cell Migration via a Ras-MEK Kinase 1 Pathway. *Cancer Res* 64: 4209-4217.
269. Yamaguchi H, Takeo Y, Yoshida S, Kouchi Z, Nakamura Y, et al. (2009) Lipid rafts and caveolin-1 are required for invadopodia formation and extracellular matrix degradation by human breast cancer cells. *Cancer Res* 69: 8594-8602.
270. Nam SW, Clair T, Campo CK, Lee HY, Liotta LA, et al. (2000) Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene* 19: 241-247.
271. Harper K, Arsenault D, Boulay-Jean S, Lauzier A, Lucien F, et al. (2010) Autotaxin promotes cancer invasion via the lysophosphatidic acid receptor 4: participation of the cyclic AMP/EPAC/Rac1 signaling pathway in invadopodia formation. *Cancer Res* 70: 4634-4643.
272. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295: 2387-2392.
273. Pustilnik TB, Estrella V, Wiener JR, Mao M, Eder A, et al. (1999) Lysophosphatidic acid induces urokinase secretion by ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 5: 3704-3710.
274. Fishman DA, Liu Y, Ellerbroek SM, Stack MS (2001) Lysophosphatidic acid promotes matrix metalloproteinase (MMP) activation and MMP-dependent invasion in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 61: 3194-3199.
275. Hope JM, Wang FQ, Whyte JS, Ariztia EV, Abdalla W, et al. (2009) LPA receptor 2 mediates LPA-induced endometrial cancer invasion. *Gynecol Oncol* 112: 215-223.
276. Wang FQ, Smicun Y, Calluzzo N, Fishman DA (2006) Inhibition of matrilysin expression by antisense or RNA interference decreases lysophosphatidic acid-induced epithelial ovarian cancer invasion. *Mol Cancer Res* 4: 831-841.
277. Wang FQ, So J, Reierstad S, Fishman DA (2006) Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 118: 879-888.
278. So J, Navari J, Wang FQ, Fishman DA (2004) Lysophosphatidic acid enhances epithelial ovarian carcinoma invasion through the increased expression of interleukin-8. *Gynecol Oncol* 95: 314-322.
279. Wu WT, Chen CN, Lin CI, Chen JH, Lee H (2005) Lysophospholipids enhance matrix metalloproteinase-2 expression in human endothelial cells. *Endocrinology* 146: 3387-3400.
280. Frankel A, Mills GB (1996) Peptide and lipid growth factors decrease cis-diamminedichloroplatinum-induced cell death in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res* 2: 1307-1313.
281. Deng W, Balazs L, Wang DA, Van Middlesworth L, Tigyi G, et al. (2002) Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiation- and chemotherapy-induced apoptosis. *Gastroenterology* 123: 206-216.

282. Song J, Clair T, Noh JH, Eun JW, Ryu SY, et al. (2005) Autotaxin (lysoPLD/NPP2) protects fibroblasts from apoptosis through its enzymatic product, lysophosphatidic acid, utilizing albumin-bound substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 967-975.
283. Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, et al. (1997) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res* 25: 151-157.
284. Murph MM, Hurst-Kennedy J, Newton V, Brindley DN, Radhakrishna H (2007) Lysophosphatidic acid decreases the nuclear localization and cellular abundance of the p53 tumor suppressor in A549 lung carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 5: 1201-1211.
285. Nam SW, Clair T, Kim YS, McMarlin A, Schiffmann E, et al. (2001) Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer Res* 61: 6938-6944.
286. Lee H, Goetzl EJ, An S (2000) Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 278: C612-618.
287. English D, Kovala AT, Welch Z, Harvey KA, Siddiqui RA, et al. (1999) Induction of endothelial cell chemotaxis by sphingosine 1-phosphate and stabilization of endothelial monolayer barrier function by lysophosphatidic acid, potential mediators of hematopoietic angiogenesis. *J Hematother Stem Cell Res* 8: 627-634.
288. Hu YL, Tee MK, Goetzl EJ, Auersperg N, Mills GB, et al. (2001) Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 93: 762-768.
289. Ramachandran S, Ramaswamy S, Cho C, Parthasarathy S (2002) Lysophosphatidic acid induces glycodelin gene expression in cancer cells. *Cancer Lett* 177: 197-202.
290. Lee J, Park SY, Lee EK, Park CG, Chung HC, et al. (2006) Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha is necessary for lysophosphatidic acid-induced vascular endothelial growth factor expression. *Clin Cancer Res* 12: 6351-6358.
291. Boucharaba A, Guillet B, Menea F, Hneino M, van Wijnen AJ, et al. (2009) Bioactive lipids lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate mediate breast cancer cell biological functions through distinct mechanisms. *Oncol Res* 18: 173-184.
292. Ptaszynska MM, Pendrak ML, Bandle RW, Stracke ML, Roberts DD (2008) Positive feedback between vascular endothelial growth factor-A and autotaxin in ovarian cancer cells. *Mol Cancer Res* 6: 352-363.
293. Merchant TE, Kasimos JN, de Graaf PW, Minsky BD, Gierke LW, et al. (1991) Phospholipid profiles of human colon cancer using ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Int J Colorectal Dis* 6: 121-126.
294. Merchant TE, Minsky BD, Lauwers GY, Diamantis PM, Haida T, et al. (1999) Esophageal cancer phospholipids correlated with histopathologic findings: a ³¹P NMR study. *NMR Biomed* 12: 184-188.
295. Sasagawa T, Okita M, Murakami J, Kato T, Watanabe A (1999) Abnormal serum lysophospholipids in multiple myeloma patients. *Lipids* 34: 17-21.
296. Xu Y, Gaudette DC, Boynton JD, Frankel A, Fang XJ, et al. (1995) Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 1: 1223-1232.
297. Tokumura A, Kume T, Fukuzawa K, Tahara M, Tasaka K, et al. (2007) Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity. *Life Sci* 80: 1641-1649.
298. Jeong KJ, Park SY, Seo JH, Lee KB, Choi WS, et al. (2008) Lysophosphatidic acid receptor 2 and Gi/Src pathway mediate cell motility through cyclooxygenase 2 expression in CAOV-3 ovarian cancer cells. *Exp Mol Med* 40: 607-616.
299. Wang GL, Wen ZQ, Xu WP, Wang ZY, Du XL, et al. (2008) Inhibition of lysophosphatidic acid receptor-2 expression by RNA interference decreases lysophosphatidic acid-induced urokinase plasminogen activator activation, cell invasion, and migration in ovarian cancer SKOV-3 cells. *Croat Med J* 49: 175-181.

300. Xu Y, Shen Z, Wiper DW, Wu M, Morton RE, et al. (1998) Lysophosphatidic acid as a potential biomarker for ovarian and other gynecologic cancers. *JAMA* 280: 719-723.
301. Witt AE, Hines LM, Collins NL, Hu Y, Gunawardane RN, et al. (2006) Functional proteomics approach to investigate the biological activities of cDNAs implicated in breast cancer. *J Proteome Res* 5: 599-610.
302. Taghavi P, Verhoeven E, Jacobs JJ, Lambooij JP, Stortelers C, et al. (2008) In vitro genetic screen identifies a cooperative role for LPA signaling and c-Myc in cell transformation. *Oncogene* 27: 6806-6816.
303. Umez-Goto M, Tanyi J, Lahad J, Liu S, Yu S, et al. (2004) Lysophosphatidic acid production and action: validated targets in cancer? *J Cell Biochem* 92: 1115-1140.
304. Yang Y, Mou L, Liu N, Tsao MS (1999) Autotaxin expression in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21: 216-222.
305. Zhang G, Zhao Z, Xu S, Ni L, Wang X (1999) Expression of autotaxin mRNA in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 112: 330-332.
306. Hoelzinger DB, Mariani L, Weis J, Woyke T, Berens TJ, et al. (2005) Gene expression profile of glioblastoma multiforme invasive phenotype points to new therapeutic targets. *Neoplasia* 7: 7-16.
307. Nouh MA, Wu XX, Okazoe H, Tsunemori H, Haba R, et al. (2009) Expression of autotaxin and acylglycerol kinase in prostate cancer: association with cancer development and progression. *Cancer Sci* 100: 1631-1638.
308. Watanabe N, Ikeda H, Nakamura K, Ohkawa R, Kume Y, et al. (2007) Both plasma lysophosphatidic acid and serum autotaxin levels are increased in chronic hepatitis C. *J Clin Gastroenterol* 41: 616-623.
309. Kazama S, Kitayama J, Aoki J, Mori K, Nagawa H (2010) Immunohistochemical Detection of Autotaxin (ATX)/Lysophospholipase D (lysoPLD) in Submucosal Invasive Colorectal Cancer. *J Gastrointest Cancer*.
310. Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, et al. (2002) Lysophosphatidic acid is a bioactive mediator in ovarian cancer. *Biochim Biophys Acta* 1582: 257-264.
311. Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, et al. (2006) Autotaxin is overexpressed in glioblastoma multiforme and contributes to cell motility of glioblastoma by converting lysophosphatidylcholine to lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* 281: 17492-17500.
312. Murph MM, Nguyen GH, Radhakrishna H, Mills GB (2008) Sharpening the edges of understanding the structure/function of the LPA1 receptor: expression in cancer and mechanisms of regulation. *Biochim Biophys Acta* 1781: 547-557.
313. Lee JH, Marshall JC, Steeg PS, Horak CE (2009) Altered gene and protein expression by Nm23-H1 in metastasis suppression. *Mol Cell Biochem* 329: 141-148.
314. Horak CE, Mendoza A, Vega-Valle E, Albaugh M, Graff-Cherry C, et al. (2007) Nm23-H1 suppresses metastasis by inhibiting expression of the lysophosphatidic acid receptor EDG2. *Cancer Res* 67: 11751-11759.
315. Guo R, Kasbohm EA, Arora P, Sample CJ, Baban B, et al. (2006) Expression and function of lysophosphatidic acid LPA1 receptor in prostate cancer cells. *Endocrinology* 147: 4883-4892.
316. Shida D, Watanabe T, Aoki J, Hama K, Kitayama J, et al. (2004) Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Lab Invest* 84: 1352-1362.
317. Gonzalez-Arenas A, Avendano-Vazquez SE, Cabrera-Wrooman A, Tapia-Carrillo D, Larrea F, et al. (2008) Regulation of LPA receptor function by estrogens. *Biochim Biophys Acta* 1783: 253-262.
318. Obo Y, Yamada T, Furukawa M, Hotta M, Honoki K, et al. (2009) Frequent mutations of lysophosphatidic acid receptor-1 gene in rat liver tumors. *Mutat Res* 660: 47-50.
319. Kitayama J, Shida D, Sako A, Ishikawa M, Hama K, et al. (2004) Over-expression of lysophosphatidic acid receptor-2 in human invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res* 6: R640-646.

320. Zeng Y, Kakehi Y, Nouh MA, Tsunemori H, Sugimoto M, et al. (2009) Gene expression profiles of lysophosphatidic acid-related molecules in the prostate: relevance to prostate cancer and benign hyperplasia. *Prostate* 69: 283-292.
321. Daaka Y (2002) Mitogenic action of LPA in prostate. *Biochim Biophys Acta* 1582: 265-269.
322. Peyruchaud O (2009) Novel implications for lysophospholipids, lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate, as drug targets in cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 9: 381-391.
323. Coleman R (2010) Denosumab for the prevention of skeletal-related events. 10th International Conference Cancer-Induced Bone Disease.
324. Cui P, Tomsig JL, McCalmont WF, Lee S, Becker CJ, et al. (2007) Synthesis and biological evaluation of phosphonate derivatives as autotaxin (ATX) inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 1634-1640.
325. Bachner D, Ahrens M, Schroder D, Hoffmann A, Lauber J, et al. (1998) Bmp-2 downstream targets in mesenchymal development identified by subtractive cloning from recombinant mesenchymal progenitors (C3H10T1/2). *Dev Dyn* 213: 398-411.
326. Rogers MS, Rohan RM, Birsner AE, D'Amato RJ (2004) Genetic loci that control the angiogenic response to basic fibroblast growth factor. *Faseb J* 18: 1050-1059.
327. Boissan M, Wendum D, Arnaud-Dabernat S, Munier A, Debray M, et al. (2005) Increased lung metastasis in transgenic NM23-Null/SV40 mice with hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 97: 836-845.
328. Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, et al. (1989) Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 342: 177-180.
329. Steeg PS, Horak CE, Miller KD (2008) Clinical-translational approaches to the Nm23-H1 metastasis suppressor. *Clin Cancer Res* 14: 5006-5012.
330. Goetzl EJ, Dolezalova H, Kong Y, Zeng L (1999) Dual mechanisms for lysophospholipid induction of proliferation of human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 59: 4732-4737.
331. Kanda H, Newton R, Klein R, Morita Y, Gunn MD, et al. (2008) Autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, promotes the entry of lymphocytes into secondary lymphoid organs. *Nat Immunol* 9: 415-423.
332. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, et al. (2004) Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10: 7466-7474.
333. Gupta S, Joshi K, Wig JD, Arora SK (2007) Intratumoral FOXP3 expression in infiltrating breast carcinoma: Its association with clinicopathologic parameters and angiogenesis. *Acta Oncol* 46: 792-797.